Bioquímica

Isolamento e purificação de proteínas

Escolha do método (Rutura química ou mecânica)
- Caracterização do tecido
- Localização celular da proteína
  - Citoplasmática
    - Lise celular (lise osmótica)
  - Plantas / Bactérias
    - Lise enzimática
    - Detergentes ou solventes orgânicos
    - Rutura mecânica: agitação com areias ou sílica; trituração a alta velocidade; french press; sonificação

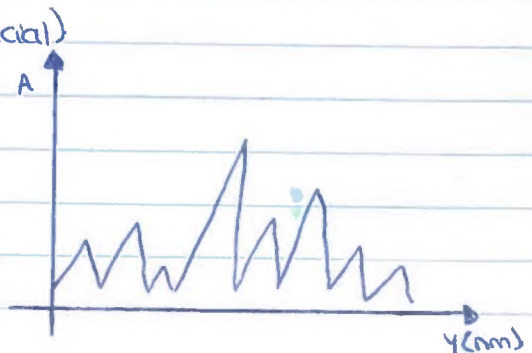
O lisado obtido é centrifugado ou filtrado para remover restos celulares da solução que contém a proteína.

Estabilização da proteína
- colocar a um pH que não as desnature
- evitar altas temperaturas → ao colocar em temperaturas baixas estamos a evitar que as proteases degradem as proteínas que queremos e também a contaminação por bactérias
- ao colocar metais pesados isolamos as proteínas de modo a não serem contaminadas por outros que alterem a sua estrutura e função
- colocar em baixa concentração de sal uma vez que queremos uma baixa força iónica e se colocássemos a alta concentração de sal estaríamos a aumentar a força iónica

Deteção da proteína
Enzimáticas
- Leitura absorvância
- Titulações potenciométricas (leitura potencial)
- Acoplamento de reações

Não enzimáticas
- Efeitos biológicos ou capacidade de ligação a substâncias

A

Y(nm)

Propriedades das proteínas exploradas pelos métodos de purificação

Característica	Procedimento
Carga	Cromatografia permuta iónica Eletroforese - mais usada para limpar proteínas Focagem isoelétrica
Polaridade	Cromatografia de adsorção Cromatografia em papel
Tamanho	Diálise e ultrafiltração Eletroforese gel poliacrilamida (SDS) Cromatografia em gel ou filtração molecular Ultracentrifugação
Especificidade	Cromatografia de afinidade

Precipitação de proteínas

- Explora a diferente solubilidade da proteína

1- alterar a polaridade do solvente para a proteína precipitar
↓
pode alterar a estrutura da proteína

2- alterar o pH (precipitação isoelétrica)

$pH < pI$ → carga + ⇒ proteínas em solução

$pH > pI$ → carga - ⇒ proteínas em solução

$pH \simeq pI$ → carga 0 ⇒ baixa solubilidade ⇒ precipitação

3- alterar a temperatura

↑ temperatura ⇒ quebra de ligações ⇒ desnaturação ⇒ precipitação

Ao desnaturar uma proteína, a sua parte hidrofóbica ficará exposta ao meio e tentará encontrar outras proteínas para se ligar. Tudo isto vai levar à precipitação das proteínas

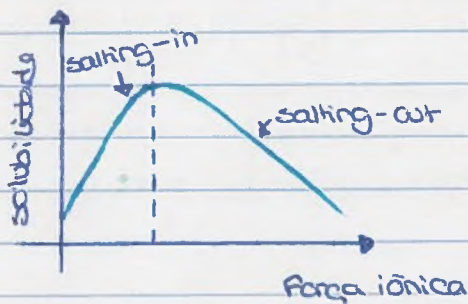
4- alterar a concentração de sais (força iónica)

1 M → alta força iónica

10^{-3} M → baixa força iónica

$$I = \frac{1}{2} \sum c_i z_i^2$$

c_i - concentração da espécie i z_i - carga da espécie i

Podemos representar o efeito de diferentes sais na solubilidade de uma proteína (esquerda) ou o efeito de um sal na solubilidade de diferentes proteínas (direita)

salting-in: quando aumentamos a força iônica e a solubilidade aumenta

salting-out: valor de força iônica a partir do qual a proteína começa a precipitar

pouco sal => maior solubilidade
muito sal => menor solubilidade => precipitação da proteína
↓
porque o sal absorve o solvente

Métodos de separação/purificação

Cromatografia permuta iônica

Base do método - carga

Resinas: catiônica - carga negativa, liga carga positiva
anionica - carga positiva, liga carga negativa

Exemplo:

Mistura de 3 proteínas: A(pI=5); B(pI=7); C(pI=9)

Resina catiônica (carga -; liga carga +)

pH inicial = 6 ; I = 10 mM

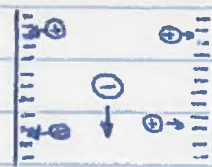
Carga das proteínas: A(-); B(+); C(+)

a coluna tem de estar no mesmo pH que a mistura de proteínas

Primeira a ser eluída: proteína A

Retidas: proteínas B e C

Como eluir B e C?

1- variar pH (aumentar) → no caso da resina aniônica é o contrário

Exemplo: pH = 8; carga de B (-) e carga de C (+) => B eluído e C retido

Depois pH ≥ 9; carga de C (≤0) => C eluído

2- aumentar a força iônica → aumentar a concentração do sal

Ao aumentar a força iônica, a coluna vai começando a ficar saturada de sal não retendo a proteína

Diagrama de eluição

A área da proteína no diagrama é tanto maior quanto a sua concentração

Nota: A proteína tem tanto mais carga quanto mais longe estiver do seu ponto isoelétrico

Cromatografia de filtração em gel/molecular

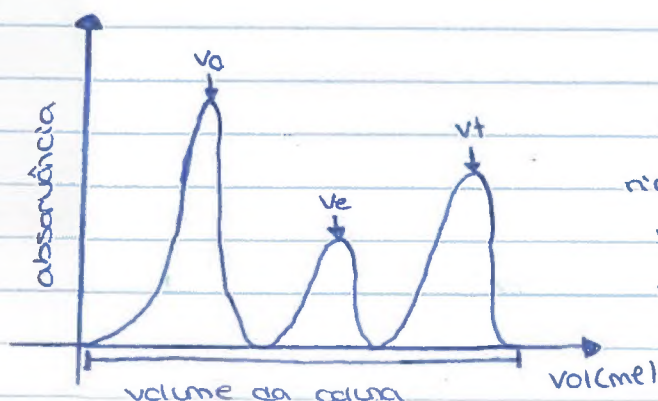
Base do método: tamanho

Fase estacionária: resina com formato em malha

O pH não é um fator de separação

menor tamanho => maior entrada na malha => demora a sair

maior tamanho => não entra na malha => sai mais depressa

$V_t = V_g + V_0 + V_i$

V_g - volume ocupado pela fase estacionária

V_0 - volume exterior à fase estacionária

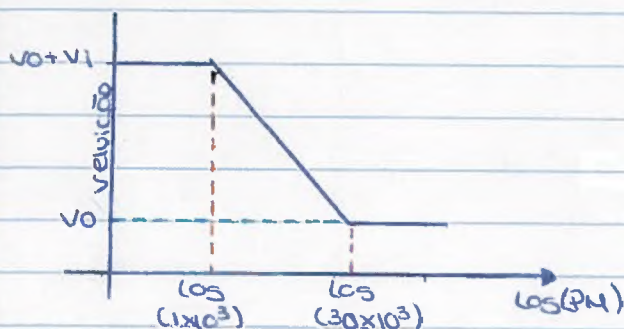
V_i - volume do interior dos poros da fase estacionária

Ve - volume a que sai cada banda
(medido ao centro da banda)

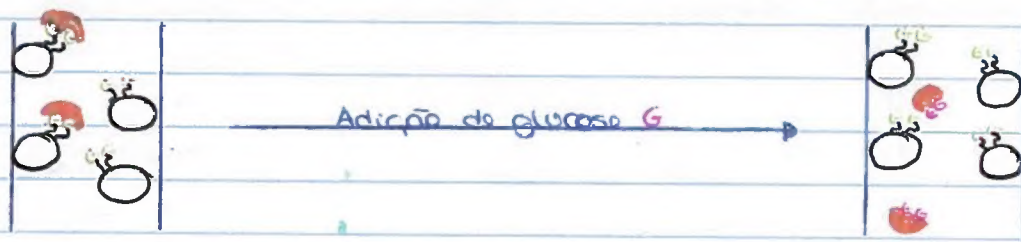
Exemplo:

Mistura de 2 proteínas: A (PM: 5 kDa); B (PM: 25 kDa)
Fase estacionária: sephadex G-50 (1-30 kDa)
1ª proteína a sair: proteína B
2ª proteína a sair: proteína A

Vg | Vi | Vo

$V_0 + V_i$ | Velocidade | V_0 | log (1×10^3) | log (30×10^3) | log(PM)

Nota: A proteína pequena passa dentro e fora dos poros ($V_0 + V_i$). A proteína grande passa somente fora dos poros (V_0) → depende da fase estacionária.

Cromatografia de afinidade

- A cromatografia de afinidade explora as potencialidades de interação entre duas moléculas biológicas: uma molécula (ligando) que interatua especificamente com a proteína em estudo encontra-se covalentemente ligada a uma matriz inerte

Adição de glucose G

A proteína que tem afinidade para a glucose (G), liga-se aos resíduos de glucose agarrados às partículas de polímero

A proteínas é eluída por adição de um tampão contendo glucose (G)

Para retirar a proteína de interesse colocamos uma maior concentração de ligando que vai competir com o já existente (imobilizado) levando ao arrastamento da proteína

A ligação proteína-ligando não pode ser covalente pois seria muito difícil remover

a proteína

Nota: Quando não há mais proteína a sair deixamos de ter absorvância a 280 nm

Cromatografia líquida de alta resolução (HPLC)

- Colunas mais eficientes (maiores e mais estreitas)
- Sem problemas de empacotamento (prontas a usar)
- Fase móvel sujeita a pressões mais elevadas

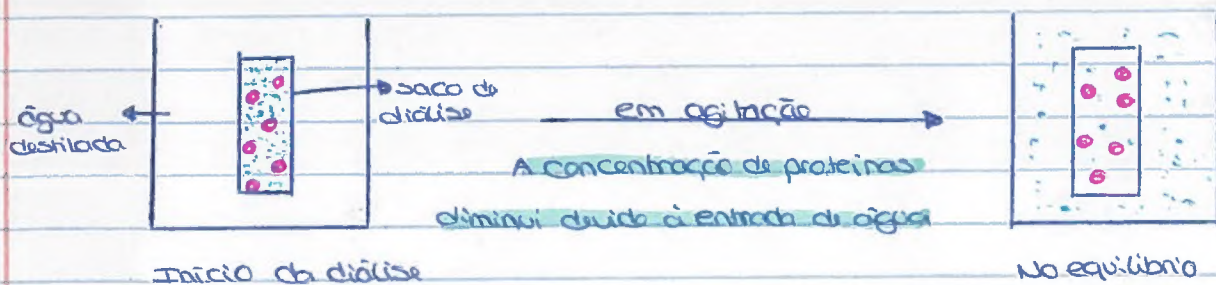
Vantagens:

- maior resolução
- mais rápido (≤1h) → devido à aplicação de pressão
- elevada sensibilidade
- automatização

querermos colunas maiores => mais estreitas devido ao preço

Diálise

A seguir a uma precipitação ou separação por gradiente de força iónica é sempre necessário separar as proteínas do excesso de sal (diminuir força iónica)

Permuta iónica → Diálise → Outro processo de purificação

O saco de diálise é impermeável a proteínas e permeável a iões e à água

Ultrafiltração

Objetivo: concentração da proteína

A mistura de sais (pouco), água e proteína é colocada no aparelho com uma membrana porosa. A porosidade da membrana tem de ser inferior ao tamanho da proteína de modo a que a mesma fique retida. É colocada pressão no siste-

ma de maneira a obrigar o líquido a passar a membrana. Este processo também baixa a concentração de sais como a diálise mas é necessário estar sempre presente

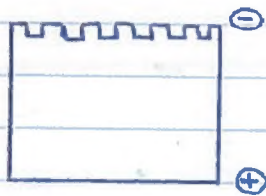
Permuta iónica → Diálise → Ultrafiltração → Outro método de purificação

Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS):
- Método de separação e visualização de proteínas
- Movimento de partículas carregadas por ação dum campo elétrico

$v = \frac{Ez}{f}$ v - velocidade de migração E - campo elétrico
z - carga formal f - Coeficiente de fricção

Base do método: peso molecular

Preparação do gel
- gel mais denso => malha mais fechada => maior dificuldade de migração
- gel menos denso => malha mais fina => maior facilidade de migração

- Acrilamida + ...
↓
"malha" de poliacrilamida

Introdução da amostra nos poços
↓
Ligar fonte de tensão
↓
Revelação de bandas

A eletroforese não é muito usada para purificar proteínas devido ao baixo volume da amostra colocada

↳ glicerol (sacarose): usado para aumentar a densidade da amostra de modo a que a amostra não "abandone" os poços quando o molde for colocado na solução tampão

↳ azul bromofenol: corante utilizado na amostra para conseguirmos acompanhar todo o processo de eletroforese e saber quando parar o circuito elétrico impe-

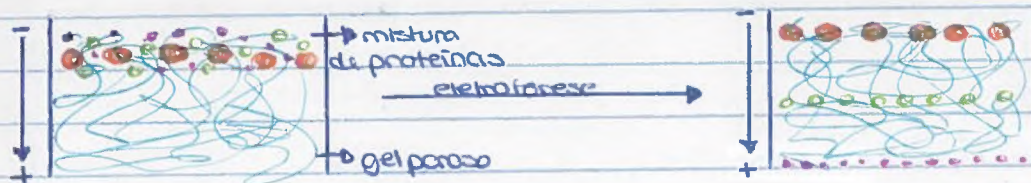
dindo que as amostras saiam do gel para a solução tampão o que levaria à perda de proteínas

↳ SDS - agente desnaturante → destrói todas as ligações não covalentes
Liga-se à proteína de 2 em 2 aminoácidos conferindo carga negativa mas não em todas as ligações pois se assim fosse, as cargas repeliam-se e a proteína desnaturava-se

A amostra é fervida de modo a facilitar a migração com base na massa e não na conformação. Após ser fervida, as proteínas desnaturam e ficam na sua estrutura mais primária facilitando a ligação de SDS que vai dar carga negativa à proteína nesta ligação. A presença de carga impede o refolding da proteína

desnaturação => perda de parte da proteína

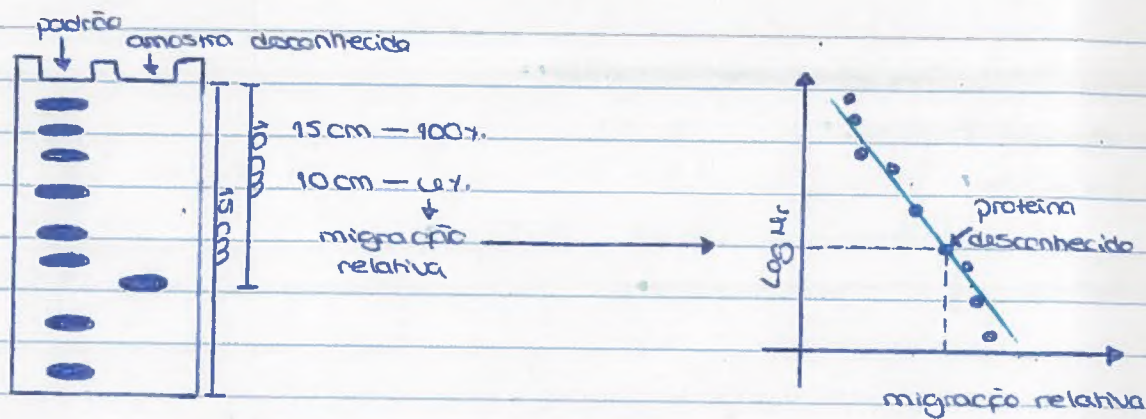
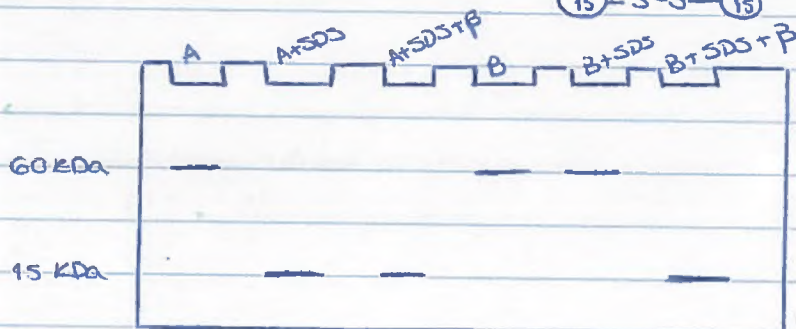
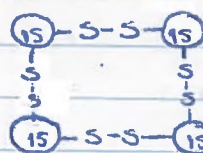
↳ β-mercaptoetanol - destrói pontes dissulfureto (se existirem)

− mistura de proteínas
eletroforese →
+ gel poroso

Separação com base no peso molecular

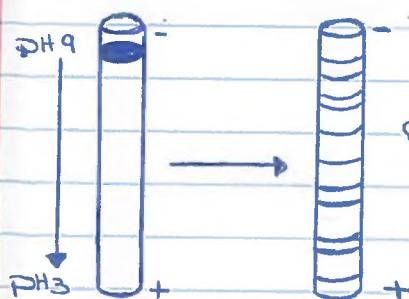
↓ tamanho => ↓ massa molecular => migram mais rapidamente para o polo positivo

↑ tamanho => ↑ massa molecular => retidos na parte inicial do gel
↓
não passam pelos poros

↳ Azul Comassie: vai reagir com as proteínas originando um complexo que vai levar à revelação das proteínas

Aplicações de eletroforese em gel
- Separação com base nos pesos moleculares
- Avaliar estado de pureza da amostra
- Estimativa peso molecular

Exemplo:

Focagem isoelétrica

Base do método: carga

As proteínas também podem ser separadas por eletroforese com base no conteúdo relativo dos seus aminoácidos acídicos e básicos

Gel de poliacrilamida de grande porosidade sem SDS e com gradiente de pH

As proteínas migram no gel até atingirem o seu ponto isoelétrico (pI)

Eletroforese bidimensional

- Combinação dos dois métodos anteriores:
  - 1º focagem isoelétrica (uma dimensão)
  - 2º Eletroforese (outra dimensão)
- Este método permite resolver até 1000 proteínas
- Não vantajoso para amostras puras (só uma dimensão)

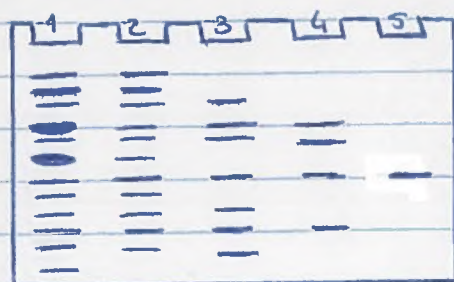
Avaliação do progresso de purificação

1º - Rebentamento das células (sobrenadante)

2º - Precipitação por aumento da força iónica

3º - Cromatografia de permuta iónica

4º - Cromatografia de filtração molecular

5º - Cromatografia de afinidade

A cada processo realizado temos de retirar uma amostra e posteriormente correr todas as amostras no gel de eletroforese

Para cada nova proteína, teremos de fazer vários processos até sermos capazes de a isolar pois não conhecemos as suas propriedades

Atividade específica (aumenta)

- Atividade: teste específico da proteína que está a ser purificada
- Quantidade total de proteína

Visualização das proteínas

- Eletroforese SDS-PAGE

$$\text{atividade específica} = \frac{\text{atividade total}}{\text{proteína total}}$$

↓

aumenta ao longo da purificação

$$\text{rendimento} = \frac{\text{atividade total no passo}}{\text{atividade do extrato bruto}}$$

↓

diminui ao longo da purificação porque vamos perdendo proteína

nível de purificação = $\frac{\text{atividade específica do passo}}{\text{atividade específica do extrato bruto}}$

↓

aumenta ao longo da purificação

Relação estrutura função em duas proteínas globulares

Desempenham funções vitais no metabolismo de alguns organismos (captura e utilização de O_2 - Hb e Mb, remoção de CO_2 - Hb)

Mioglobina (Mb): possui um grupo hemo com centro metálico de ferro; atua em células musculares e tecidos.

Hemoglobina (Hb): possui 4 subunidades semelhantes à mioglobina; atua no sangue

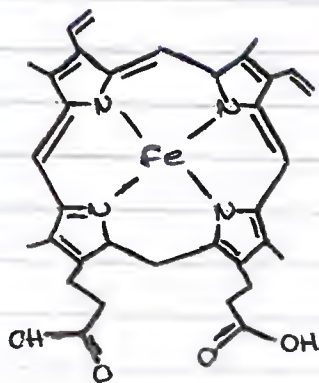
Semelhanças:

- capacidade de captar O_2
- grupo hemo (Mb-1; H-4) do tipo b
- estrutura secundária hélice α
- não têm aminoácidos que ligam o O_2
- o O_2 liga-se ao grupo hemo

Diferenças

- Mb liga só um O_2
- Hb liga até 4 O_2

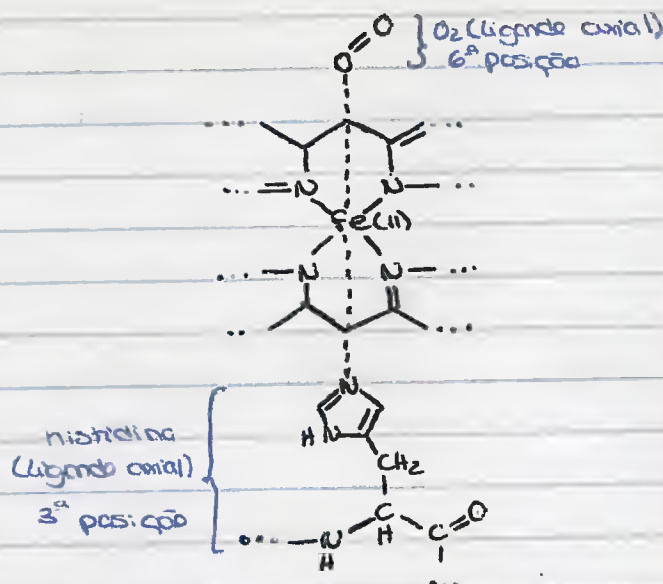
Ter 4 subunidades dá à hemoglobina características não presentes na mioglobina

Grupos Hemo

Os tipos de grupo hemo diferem pelo tipo de ligandos ao anel de porfirina

O hemo do tipo b está ligado a uma cadeia lateral de uma histidina por uma ligação covalente (mais fraca que o hemo c) → ligação axial

O hemo do tipo c possui uma ligação tioéter (covalente) a duas cisteínas → mais difícil de destruir

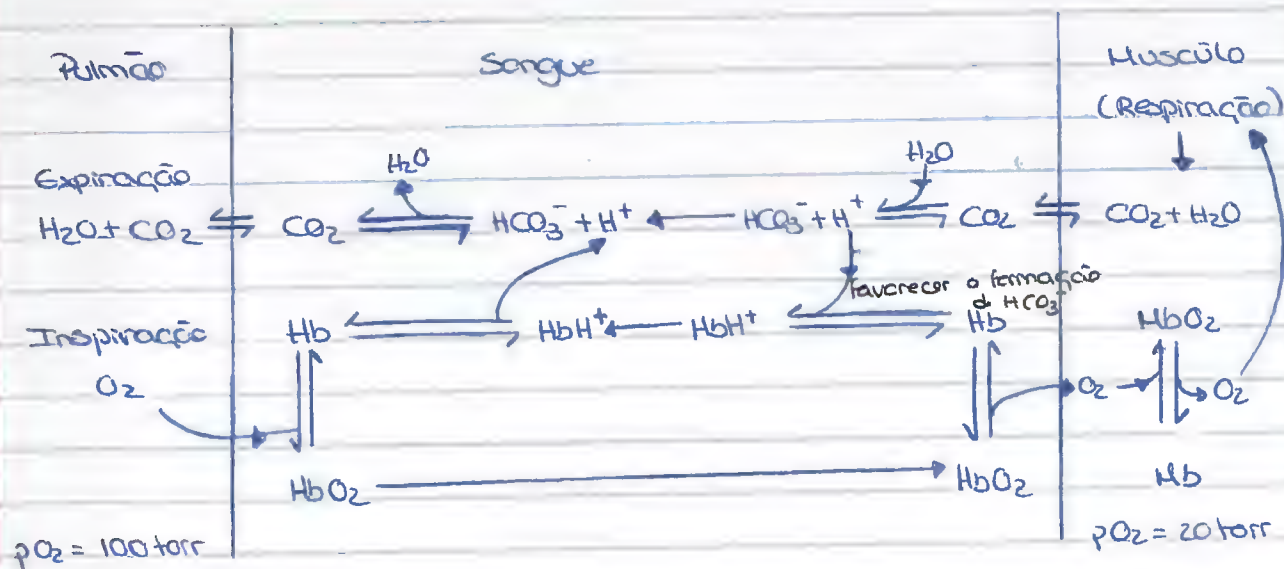
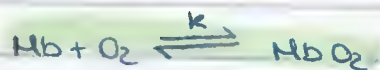
b ____ citocromo c → hemo do tipo c

protoporfirina IX
↓
4 anéis pirrólicos
4 grupos metilo
2 grupos propionato
2 grupos vinil
↓
heme do tipo b

DeoxiHb (Fe^{2+} - 6ª posição - livre)
OxiHb (Fe^{2+} - 6ª posição - O_2)
MetaHb (Fe^{2+} - 6ª posição - H_2O)

Qualquer composto que tenha maior afinidade para o ferro do que o O_2 é tóxico (ex: CO, NO, H_2S)

Funções da hemoglobina e da mioglobina

Hemoglobina - transportador de O_2
Mioglobina - armazenador de O_2 (capta → armazena → liberta quando preciso)

Ligação do oxigénio à mioglobina

$$Mb + O_2 \overset{K}{\rightleftharpoons} MbO_2$$

Constante de dissociação: $K = \frac{[Mb][O_2]}{[MbO_2]}$

fração de saturação: $Y_{O_2} = \frac{[MbO_2]}{[Mb] + [MbO_2]}$ (0-1)

$[MbO_2] = \frac{[Mb][O_2]}{K} \Rightarrow Y_{O_2} = \frac{\frac{[Mb][O_2]}{K}}{[Mb] + \frac{[Mb][O_2]}{K}} \Leftrightarrow Y_{O_2} = \frac{[Mb]\frac{[O_2]}{K}}{[Mb]\left(1 + \frac{[O_2]}{K}\right)} \Leftrightarrow$

$\Leftrightarrow Y_{O_2} = \frac{\frac{[O_2]}{K}}{1 + \frac{[O_2]}{K}} \Leftrightarrow Y_{O_2} = \frac{\frac{K[O_2]}{K}}{\frac{K + K[O_2]}{K}} \Leftrightarrow Y_{O_2} = \frac{[O_2]}{K + [O_2]}$

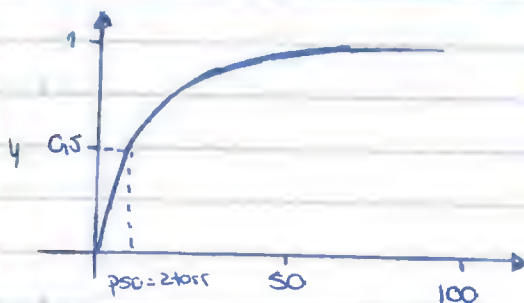
como O_2 é gás $\Leftrightarrow$ $Y_{O_2} = \frac{P_{O_2}}{K + P_{O_2}}$

A fração de saturação é 0 se não tivermos moléculas de O_2

A fração de saturação é 1 se todas as moléculas estiverem ligadas ao O_2

↑ O_2 ligado ⇒ ↑ fração de saturação

↓ O_2 ligado ⇒ ↓ fração de saturação

Quando $Y_{O_2} = 0,5$, $K = P_{O_2}$, sendo designado de P_{50} (valor de pressão de O_2 para saturar 50% das moléculas)

$Y_{O_2} = \frac{P_{O_2}}{P_{50} + P_{O_2}}$ → curva de saturação hiperbólica

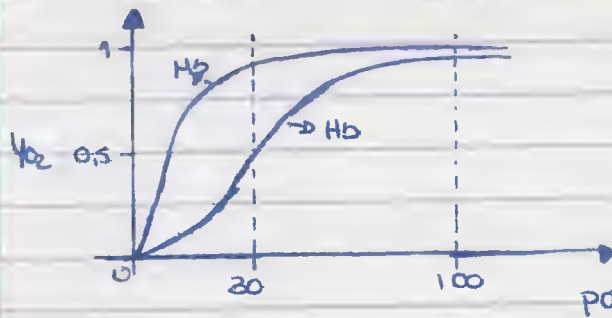
maior afinidade para o oxigénio = à mesma pressão temos maior fração de saturação

↓ P_{50} ⇒ ↑ afinidade para o O_2

P_{50} é uma medida de afinidade para o O_2

Curva de dissociação de O_2 da Mb e da Hb

curva mioglobina - hiperbólica
curva hemoglobina - sigmoidal

P = 100 torr → pressão de O_2 nos pulmões
pO_2 (torr) P = 30 torr → pressão de O_2 nos tecidos

Proteína	Sangue arterial Y_{O_2} (100 torr)	Sangue venoso (30 torr)	ΔY_{O_2}
Mb	0,97	0,91	0,06
Hb	0,95	0,55	0,40

ΔY_{O_2} → libertação de O_2 que liga nos pulmões

A mioglobina tem tanta afinidade com o O_2 que quase não o liberta (0,06) o que seria péssimo para um transportador, mas bom para armazenador

Um bom transportador liga bem o O_2 nos pulmões (100 torr) e é capaz de libertar nos tecidos (30 torr)

Processo cooperativo - processo que tem alguma resistência ao início mas que após determinado ponto se dá muito facilmente (curva sigmoidal)

↑ declive ⇒ ↑ processo cooperativo (tem de ser curva sigmoidal.

Cooperatividade positiva - quando a ligação de uma molécula facilita a ligação de uma outra (ou a mesma) molécula (neste caso, quando a ligação de uma molécula facilita a ligação do oxigénio)

Homocooperatividade positiva - quando a ligação de uma molécula facilita a ligação da mesma molécula (neste caso, a ligação de oxigénio facilita a ligação de mais oxigénio)

Mecanismo da ligação cooperativa do O_2

Deoxihemoglobina $\xrightarrow{O_2}$ Oxihemoglobina

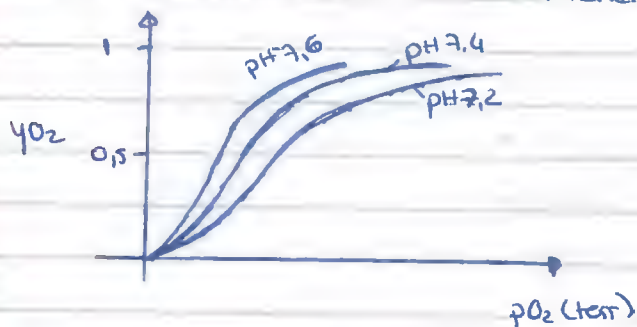
- A entrada sucessiva de moléculas de O_2 é cada vez mais fácil (cooperatividade positiva) - curva sigmoidal
- A ligação de uma molécula de O_2 induz alterações conformacionais numa sub-unidade (alosteria) que se propagam às restantes
- As alterações conformacionais são devidas à quebra de ligações iónicas e de pontes de hidrogénio entre as diferentes sub-unidades que resulta numa estrutura mais compacta da oxiHb comparativamente à deoxiHb.

Efeito de Bohr

- efeito do pH na afinidade da hemoglobina para o oxigénio

$Hb(O_2)_n H_x + O_2 \rightleftharpoons Hb(O_2)_{n+1} + H^+$ libertação de H^+ quando Hb liga O_2

$\downarrow pH \Rightarrow \uparrow [H^+] \Rightarrow \downarrow$ afinidade para o oxigénio

Curvas menos saturadas => menor afinidade

Cooperatividade negativa - quando o aumento da concentração de uma molécula afeta negativamente a ligação a outra ou à mesma molécula. (neste caso, o aumento de H^+ afeta negativamente a reação)

Heterocooperatividade negativa - quando a ligação de uma molécula dificulta a ligação de uma outra molécula (neste caso, ao ligar-se a H^+ está a afetar negativamente a ligação do O_2)

- explica mecanisticamente como o O_2 é fornecido aos músculos de forma mais eficiente quando estes se encontram em grande atividade.

$pH = 7,4$ —(provocado por ácido láctico)→ $pH = 7,2$

repouso — atividade

$P = 30$ torr — $P = 20$ torr

A Hb a 7,2 liberta mais 10% de O_2 que o normal (pH 7,4) devido a uma maior necessidade de oxigenação dos músculos.

Transporte de CO_2 no sangue

Pulmões (elevada P_{O_2})

$(Hb(O_2)_n)H_{H^+} + O_2 \rightleftharpoons Hb(O_2)_{n+1} + H^+$ → dá-se no sentido direto

$CO_2 + H_2O \rightleftharpoons H^+ + HCO_3^-$ → dá-se no sentido inverso

- Ligação de O_2 à Hb conduz à libertação de H^+ (anteriormente ligados) induzindo a libertação de CO_2

Tecidos

$CO_2 + H_2O \rightleftharpoons H^+ + HCO_3^-$ → dá-se no sentido direto

$(Hb(O_2)_n)H_{H^+} + O_2 \rightleftharpoons Hb(O_2)_{n+1} + H^+$ → dá-se no sentido inverso

- CO_2 formado nas células leva à produção de H^+
- H^+ liga-se a Hb induzindo a libertação de O_2
- O H^+ capturado estimula a formação de HCO_3^-

Efeito de BPG na ligação do O_2

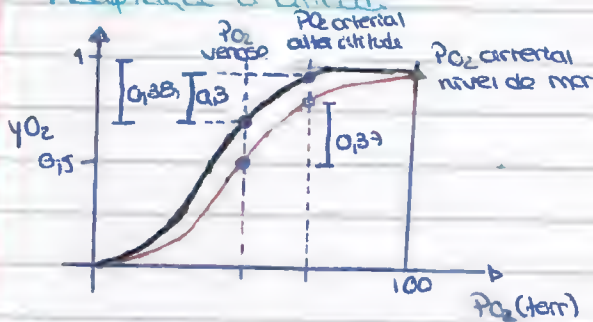
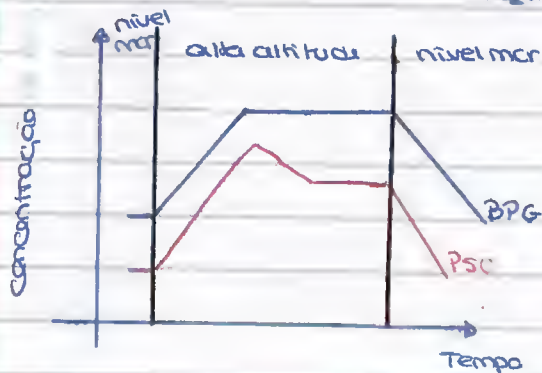
glóbulos vermelhos (tem Hb) —(glicólise)→ BPG (metabolito da

BPG liga-se na razão 1:1 à deoxiHb e quase nada à OxiHb

Oxi ⇄ Deoxi → para colocar na forma OxiHb tiveram de ser quebradas muitas ligações

↑[BPG] ⇒ ↓ afinidade da Hb para o O_2 (curvas deslocadas para a direita)
↓
heterocooperatividade negativa

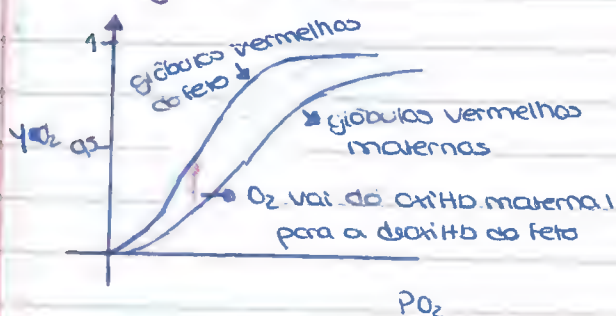
BPG liga-se na cavidade central da desoxiHb (ligações iónicas), estabilizando-a
Na forma oxiHb a cavidade não tem dimensões para estabilizar

Adaptação à altitude

situação normal - curva preta
maior [BPG] - curva vermelha

P50 aumenta
↓
Menor afinidade para O_2
↓
Maior libertação de O_2 nos capilares

Quando estamos a maior altitude é produzido mais BPG

maior altitude => ↓ $[O_2]$ ⟶ ainda não aumentou muito o BPG
↓ ar mais rarefeito
↓ pouco tempo a alta altitude

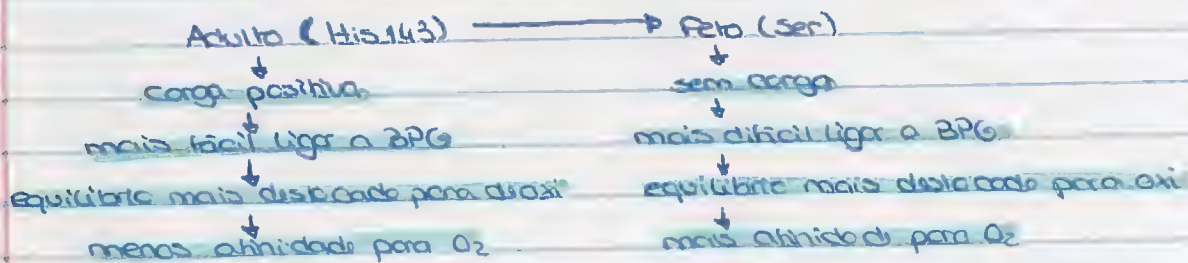
Depois de muito tempo a alta altitude, a [BPG] aumenta sendo repostos os níveis de O_2 normais no sangue.
Quando se volta para o nível do mar temos, inicialmente, maior fornecimento de O_2 pois ainda estamos com alta [BPG].

Hemoglobina fetal

A curva do feto não pode ser sobreponível à curva materna pois a Hb do feto tem de ter maior afinidade para o O_2 e absorver o O_2 da Hb materna.

A maior afinidade ao O_2 da HbF deve-se ao facto da ligação a BPG ser mais fraca do que na Hb materna.

As subunidade de Hb do feto são diferentes e ao longo do tempo vão sendo alterados para as de um adulto.

Adulto (His 143) → Feto (Ser)

Adulto (His 143)	Feto (Ser)
↓ carga positiva	↓ sem carga
↓ mais fácil ligar a BPG	↓ mais difícil ligar a BPG
↓ equilíbrio mais deslocado para desoxi	↓ equilíbrio mais deslocado para oxi
↓ menos afinidade para O_2	↓ mais afinidade para O_2

Enzimologia

Conceitos gerais

- Enzimas são catalisadores biológicos: proteínas cuja função é acelerar as reações químicas que são necessárias à célula
- Alteram a velocidade sem alterar a constante de equilíbrio da reação
- Podem necessitar de um cofator não proteico para a atividade
- Estão sujeitas a regulação

Apoenzima + Cofator → Holoenzima
(inativa) (ativa)

Catalisador: substância que aumenta a velocidade de uma reação química sem ser consumida no processo. Não afeta a constante de equilíbrio; diminui a energia de ativação

Cofator: molécula pequena, orgânica ou inorgânica, necessária para a atividade enzimática

Substrato: molécula sobre a qual atua a enzima (reagente)

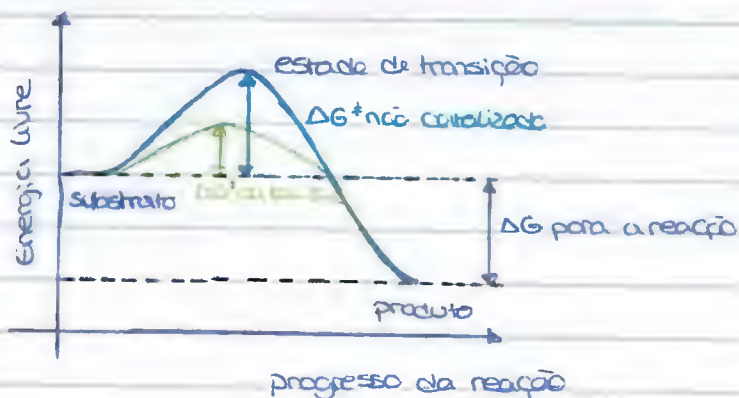
Isoenzimas: enzimas que catalisam a mesma reação

Propriedades gerais das enzimas

As enzimas diferem dos catalisadores químicos em vários aspetos:

- Velocidades de reação mais elevadas: normalmente 10^6 a 10^{12} vezes superiores às reações não catalizadas e superiores em várias ordens de grandeza às reações catalisadas quimicamente
- Condições de reação mais suaves: T≤100°C, pressão atmosférica, pH ≈ 7,0. contrariamente a catálise química ocorre muitas vezes a pressões e temperaturas elevadas e a pH extremos
- Especificidade reacional elevada: elevado grau de especificidade e relação ao(s) substrato(s) e ao(s) produto(s) ⇒ uma reação enzimática raramente tem produtos secundários
- Regulação da reação: a atividade enzimática é controlada não só pelo(s) substrato(s) e/ou produto(s), bem como por outras substâncias. Os mecanismos de regulação enzimática incluem o controlo alostérico (hemoglobina), modificação covalente da enzima e controlo da quantidade de enzima sintetizada

As enzimas são catalisadores biológicos.

Atuam baixando a energia do estado de transição

Cofatores e coenzimas

- Iões metálicos
- Grupos prostéticos (ex: heme, centro Fe-S)
- Coenzimas (derivados de vitaminas)

Exemplos de elementos inorgânicos usados como cofatores

- Cu^{2+} – citocromo c oxidase
- Fe^{2+}/Fe^{3+} – citocromo c oxidase, catalase, peroxidase
- K^+ – piruvato cinase
- Mg^{2+} – hexocinase, glucose 6-fosfatase, piruvato cinase
- Mn^{2+} – arginase, redutase de ribonucleótidos

Mo - dinitrogenase
Ni^{2+} - urease
Se - glutationa peroxidase
Zn^{2+} - anidrase carbónica, álcool desidrogenase, carboxipeptidase A e B

Exemplos de coenzimas / vitaminas

Coenzima	Função principal	Percursor nos mamíferos
FAD	Oxidação - redução	Riboflavina (Vitamina B_2)
NAD	Oxidação - redução	Vitamina PP (ác. nicotínico)
Ácido lipóico	Descarboxilação oxidativa	Ácido lipóico
Coenzima A	Transferência de grupos acilo	Ácido pantoténico
Coenzimas de cobamida	Transferência de grupos metilo	Vitamina B_{12}
Piridoxal fosfato	Metabolismo dos aminoácidos	Vitamina B_6

Nomenclatura / Classificação das enzimas

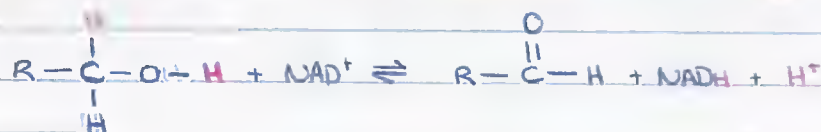
As enzimas são classificadas com base nas reações que catalisam:
Nome do substrato + sufixo ase

Ex:
Urease - hidrólise da ureia
ATP + D-glucose → ADP + D-glucose 6-fosfato   hexocinase
E.C. 2.7.1.1 (classificação internacional)
Os nºs representam a classe, subclasse, sub-subclasse, e um nº arbitrário dentro da sub-subclasse.

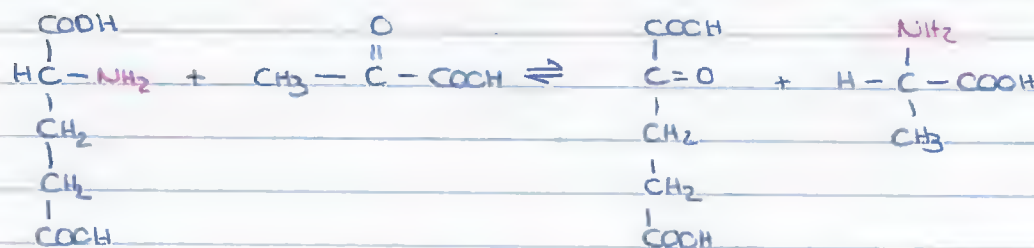
Classe	Reação catalisada
Oxidoredutases	Transferência de eletrões (iões hidreto ou átomos de H)
Transferases	Reações de transferência de grupos
Hidrolases	Reações de hidrólise (transf. grupos funcionais para a água)
Liases	Ad. grupos a lig. duplas ou form. duplas por rem. grupos
Isomerases	Transferência de grupos na molécula para fazer isómeros
Ligases	Form. lig. C-C, C-S, C-O, C-N por cond. e hidrólise de ATP

1- Oxidorredutases: enzimas que catalizam reações de oxidação - redução

Exemplo: Oxidação do etanol a aldeído pela álcool desidrogenase

$$R-\underset{H}{\overset{H}{C}}-O-H + NAD^+ \rightleftharpoons R-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-H + NADH + H^+$$

2- Transferases: enzimas que transferem grupos funcionais entre dadores e aceitadores

Exemplo: reacção catalisada por uma transferase do grupo amino (aminotransferase)

$$HOOC-CH_2-CH_2-CH(NH_2)-COOH + CH_3-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-COOH \rightleftharpoons HOOC-CH_2-CH_2-C(=O)-COOH + H-\underset{CH_3}{\overset{NH_2}{C}}-COOH$$

L-ácido glutâmico (aminoácido 1) | Ácido piruvico (keto ácido 1) | α-Ácido Ketoglutárico (keto ácido 2) | L-alanina (aminoácido 2)

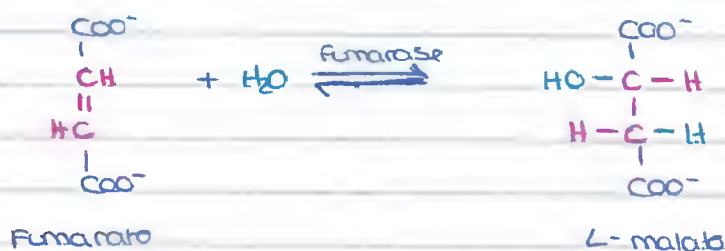
3- Hidrolases: enzimas que transferem grupos funcionais para a água

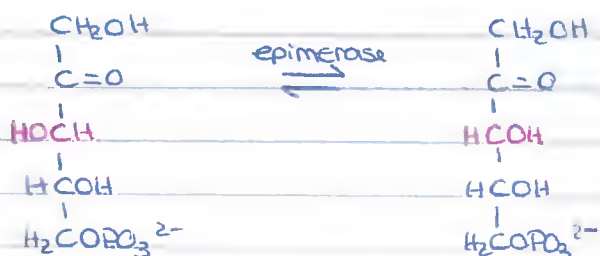
Exemplo: Quebra de uma ligação peptídica

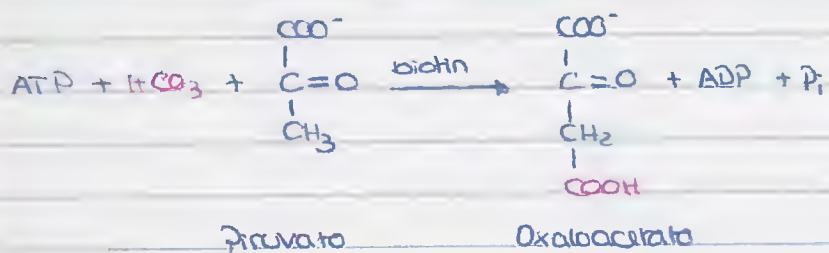
$$R_1-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-NH-R_2 + H_2O \xrightarrow{hidrólise} R_1-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-O^- + H_3N^+-R_2$$

4- Liases: Adicionam ou removem elementos (H_2O, amónia ou CO_2) a ligações duplas

$$^-OOC-CH=CH-COO^- + H_2O \underset{}{\overset{fumarase}{\rightleftharpoons}} {}^-OOC-\underset{H}{\overset{}{C}}(OH)-\underset{H}{C}H-COO^-$$

Fumarato → L-malato

5- Isomerases: enzimas que catalizam reações de isomeração

$$CH_2OH-C(=O)-HOCH-HCOH-H_2COPO_3^{2-} \overset{epimerase}{\rightleftharpoons} CH_2OH-C(=O)-HCOH-HCOH-H_2COPO_3^{2-}$$

6 - Ligases: enzimas que "ligam" moléculas à custa de grupos fosfato.

$$ATP + HCO_3^- + \underset{\text{Piruvato}}{\begin{matrix} COO^- \\ | \\ C=O \\ | \\ CH_3 \end{matrix}} \xrightarrow{\text{biotin}} \underset{\text{Oxaloacetato}}{\begin{matrix} COO^- \\ | \\ C=O \\ | \\ CH_2 \\ | \\ COOH \end{matrix}} + ADP + P_i$$

O centro ativo

A reação ocorre no centro ativo:

- contém os resíduos de aminoácidos diretamente envolvidos na reação.
- ocupa uma parte relativamente pequena do volume total da enzima.
- trata-se de uma entidade tridimensional
- corresponde, geralmente, a uma cavidade na molécula da enzima, com um ambiente químico muito próprio.
- o substrato entra no sítio ativo e liga-se à enzima através de interações fracas não-covalentes

Os centros ativos são "desenhados" para ligar o substrato e estabilizar o estado de transição

- cavidades hidrofóbicas excluem água (exceto quando H_2O é reagente).
- modelo do encaixe induzido: a enzima sofre alteração conformacional após li-ligação do substrato

Poder catalítico e especificidade

As enzimas aceleram as reações em fatores da ordem de vários milhões de vezes (baixando a energia de ativação) devido ao seu elevado poder catalítico e à sua elevada especificidade.

⇓

permitem que o(s) substrato(s) se apresente(m) num ambiente e numa orientação ótimos para que a reação ocorra:

- Rearranjos / formação de ligações covalentes entre a enzima e o substrato
- Formação de interações não-covalentes entre a enzima e o substrato → formação do complexo específico ES → energia de ligação, ΔG_B (energia libertada devido ao estabelecimento de ligações não covalentes)

Cinética enzimática

- Estuda a velocidade das reações enzimáticas e a forma como esta varia com concentração de substrato, condições do meio reacional (I, pH, ...) e na presença de inibidores ou ativadores
- No laboratório medem-se as velocidades da reação em diferentes condições
- Na teoria constroem-se modelos matemáticos que se ajustam aos resultados experimentais. Estes modelos caracterizam-se por depender de parâmetros que têm significado físico definido.

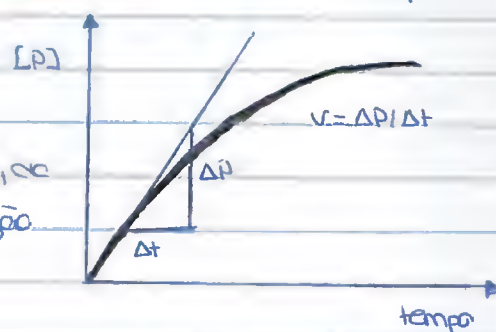
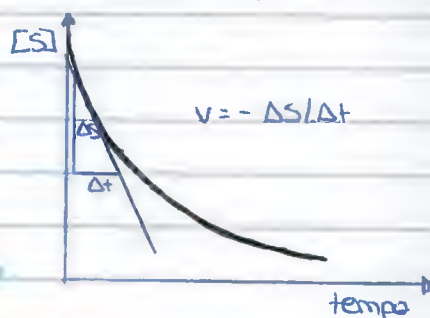
↓

A informação obtida pode:

- ser útil do ponto de vista experimental (aplicações práticas das enzimas)
- usada para estabelecer mecanismos catalíticos e identificar os aminoácidos envolvidos na catálise

Curvas de evolução temporal: S (ou P) em função de t

$$v = -\frac{d[S]}{dt} = \frac{d[P]}{dt}$$

- A velocidade da reação, isto é, o declive das curvas de evolução de S diminui com o tempo até se atingir o equilíbrio:
  - A reação inversa torna-se predominante com a acumulação do(s) produto(s)
  - No equilíbrio a velocidade de conversão de S em P iguala a velocidade de conversão de P em S e $v=0$
  - A enzima torna-se instável no decurso da reação
  - O grau de saturação da enzima pelo substrato diminui à medida que o substrato é consumido
  - Os produtos de reação inibem a enzima
- As curvas de evolução dependem, essencialmente, do pH, T, f.i., polaridade, tipo de substrato e da concentração de enzima

- Uma cinética de saturação implica a existência de um complexo enzima-substrato

$$E + S \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} ES \underset{k_{-2}}{\overset{k_2}{\rightleftharpoons}} E + P$$

- 4 variáveis ≡ 4 concentrações: [E], [S], [P] e [ES]
- 4 parâmetros ≡ 4 constantes de velocidade
  - 2 constantes de primeira ordem (k_1 e k_2) (unidades, s^{-1})
  - 2 constantes de segunda ordem (k_1 e k_{-2}) (unidades, $M^{-1}s^{-1}$)

Nota: só se podem comparar constantes com a mesma unidade. Transformar as de 2ª ordem em pseudo-primeira ordem: $k_1[S]$ e $k_2[P]$

- 4 equações diferenciais descrevem a variação temporal das 4 espécies
- 2 equações de balanços de massas:
  - substrato: $[S_0] = [S] + [ES] + [P]$
  - enzima: $[E_T] = [E] + [ES]$

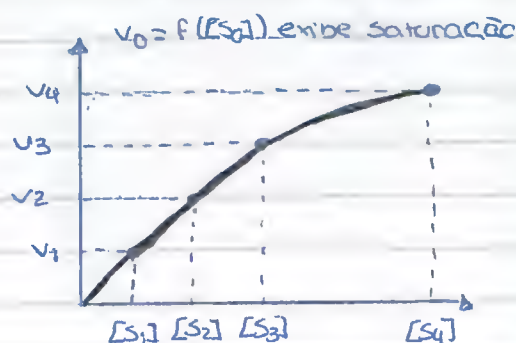
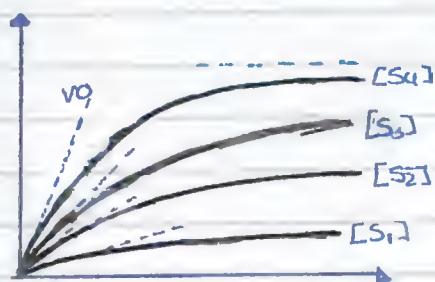
O número de variáveis e de parâmetros a determinar é bastante grande. Por isso temos de ter em conta as hipóteses restritivas

Hipóteses restritivas

Situações que têm de ser validadas do ponto de vista laboratorial e apenas nestas condições é que a equação de Michaelis-Menten pode ser usada para interpretar dados e determinar parâmetros

- as velocidades são determinadas a partir da tangente na origem da curva de evolução temporal ([P] vs tempo) ⇒ nestas condições pode-se desprezar a reação de conversão de produto em ES (k_{-2}) porque a concentração de produto é muito baixa

Determinação exprimental

- Na fase inicial da reação, a conversão de S em P é pequena ⇒ $[S_T] \simeq [S_0]$ e $[P] \simeq 0$ ⇒
⇒ a reação inversa é desprezada (é anulado qualquer efeito do(s) produto(s))

v_0 em função [S] hipérbole

- Determinam-se as tangentes na origem das curvas [P] vs tempo, para diferentes valores de concentração de substrato, usando $[E_T]$ constante
- As curvas de evolução são, normalmente, lineares até ≃ 20% de conversão de substrato em produto

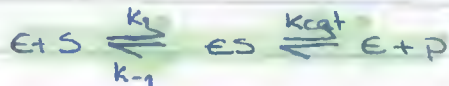
Hipótese do estado estacionário [illegible]

se a concentração de substrato for muito superior à concentração de enzima, a concentração do intermediário ES é sempre muito baixa e pode considerar-se constante ao longo do tempo ($d[ES]/dt = 0$)

- à exceção dos segundos iniciais, normalmente milisegundos, $[ES]$ é constante até à exaustão de S $\Leftrightarrow$ a velocidade de formação de ES terá de ser igual à velocidade de consumo, isto é, $d[ES]/dt = 0$

- Modelo geral: $E + S \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} ES \underset{k_{-2}}{\overset{k_2}{\rightleftharpoons}} E + P$

↓ hipóteses restritivas

Modelo cinético de Michaelis-Menten

$$E + S \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} ES \overset{k_{cat}}{\rightleftharpoons} E + P \qquad v = k_{cat}[ES]$$

- Equações simplificadas:

1- Equações diferenciais

$$v = \frac{d[P]}{dt} = k_{cat}[ES] \quad \text{(velocidade inicial)}$$

$$\frac{d[ES]}{dt} = \underbrace{k_1[E][S]}_{\text{produzido}} - \underbrace{(k_{-1}[ES] + k_{cat}[ES])}_{\text{consumido}} = 0$$

2- Balanço de massas

$$[S_0] = [S] \quad ([S] \gg [E_T]) \quad \text{(estado estacionário)}$$

$$[E_T] = [E] + [ES]$$ → aqui temos a conservação total da enzima

Dedução da equação de velocidade do modelo de Michaelis-Menten

$$E + S \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} ES \overset{k_{cat}}{\rightleftharpoons} E + P$$

- Objetivo: expressar V_0 em função dos parâmetros do modelo (k_1, k_{-1}, k_{cat}) e de concentrações conhecidas ($[S_0]$ e $[E_T]$)
- Utilizam-se as expressões da velocidade inicial, a hipótese de estado estacionário e as equações de balanço de massa da enzima e do substrato

$v_0 = \left[\frac{d[P]}{dt}\right]_0 = k_{cat}[ES]$ velocidade inicial

$\frac{d[ES]}{dt} = k_1[E][S] - (k_{-1} + k_{cat})[ES] = 0$ estado estacionário

$[E_T] = [E] + [ES]$ conservação total da enzima

$[S_0] = [S]$ estado estacionário

$$\begin{cases} k_1[E][S] = (k_{-1} + k_{cat})[ES] \\ [S] = [S_0] \\ [E_T] = [E] + [ES] \end{cases} \Leftrightarrow \begin{cases} [E] = [ES] \cdot \frac{k_{-1} + k_{cat}}{k_1} \cdot \frac{1}{[S]} \\ ____ \\ ____ \end{cases} \Leftrightarrow$$

$$\Leftrightarrow \begin{cases} [E] = [ES]\, K_m \frac{1}{[S_0]} \\ ____ \end{cases} \Leftrightarrow \begin{cases} [E_T] = [ES]\frac{K_m}{[S_0]} + [ES] \Leftrightarrow [E_T] = [ES]\left(\frac{K_m}{[S_0]} + 1\right) \Leftrightarrow \end{cases}$$

$$\Leftrightarrow [ES] = \frac{[E_T]}{1 + \frac{K_m}{[S_0]}} \Leftrightarrow [ES] = \frac{[E_T][S_0]}{[S_0] + K_m}$$

- Substituindo na equação de v_0, vem:

$V_{max} = k_{cat}[E_T]$

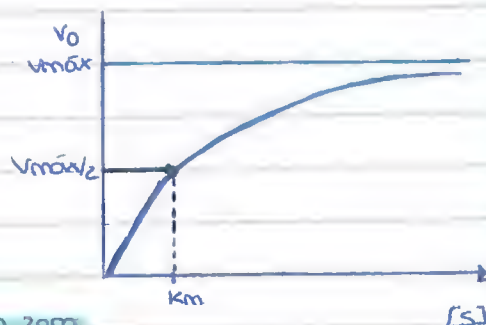
$$v_0 = k_{cat}[ES] \Leftrightarrow v_0 = \frac{k_{cat}[E_T][S_0]}{[S_0] + K_m} \Leftrightarrow v_0 = \frac{V_{máx}[S_0]}{K_m + [S_0]}$$ → equação de Michaelis-Menten

- K_M constante M-M

Representação gráfica

$$v_0 = \frac{V_{máx}[S_0]}{K_m + [S_0]}$$

↓

Hipérbole retangular

Reação de 1ª ordem:

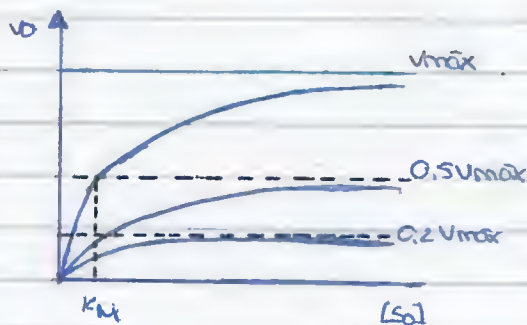
$[S_0] = K_m$ $v_0 = (V_{máx}/K_m)[S_0]$

Reação de ordem zero

$[S_0] > K_m$ $V_0 = V_{máx}$

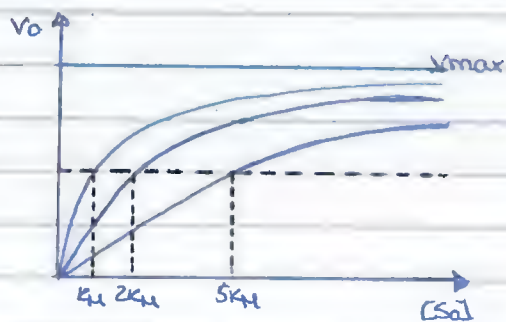
Significado físico dos parâmetros Vmáx e km

- Variação da Vmáx

$V_{max} = k_{cat} [E]$

Vmáx depende da [E] → corresponde a v_0 quando toda a enzima está saturada com substrato

$V_0 = V_{máx}$ para $[S] \gg K_M$

- Variação de K_M

$$K_M = \frac{k_{-1} + k_{cat}}{k_1}$$

K_M é uma medida de afinidade entre a enzima e o substrato

↑ Km ⇒ ↓ afinidade

Determinação experimental de Vmáx e K_M

1- Ajuste direto do modelo Michaelis-Menten recorrendo a regressões não lineares

Usam-se pontos experimentais e prevê-se o valor de velocidade máxima (assíntota)

Para diminuir a percentagem de erro associado devem ser feitos mais ensaios experimentais.

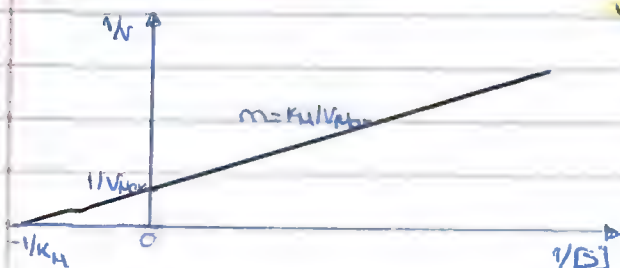
2- Linearizações da equação de Michaelis-Menten (necessário menos pontos experimentais)

Linearização de Lineweaver-Burk.

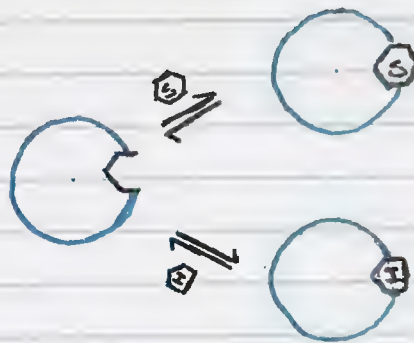
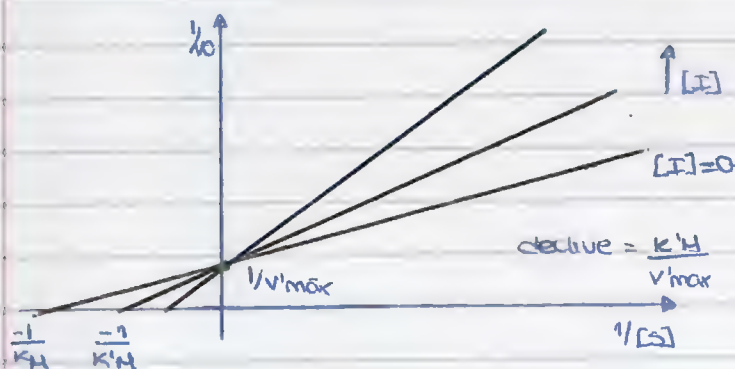
$$v = \frac{V_{max}[S]}{km + [S]}$$ → equação M-M

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_{max}} + \frac{K_M}{V_{max}} \cdot \frac{1}{[S]}$$

↓ ↓ ↓ ↓

y = b + m x

Tipos de inibição enzimática

Inibição competitiva

$$E + S \rightleftharpoons ES \rightleftharpoons E + P$$
$$+ \; I \; \Updownarrow K_I \; EI$$

$$\frac{1}{v_0} = \left(\frac{K'_M}{V'_{max}}\right)\frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}}$$

- A enzima, quando ligada ao inibidor, vai ter menos afinidade pelo substrato, aumentando K_M, denominando-se K'_M

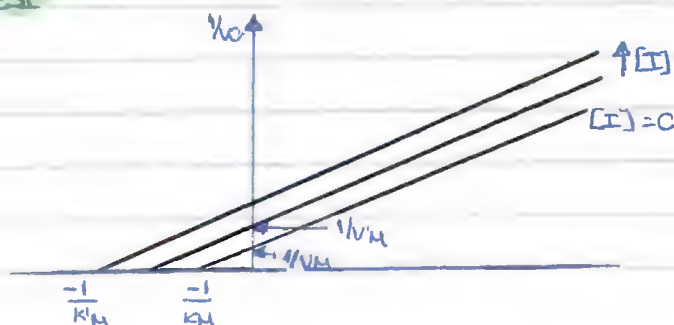
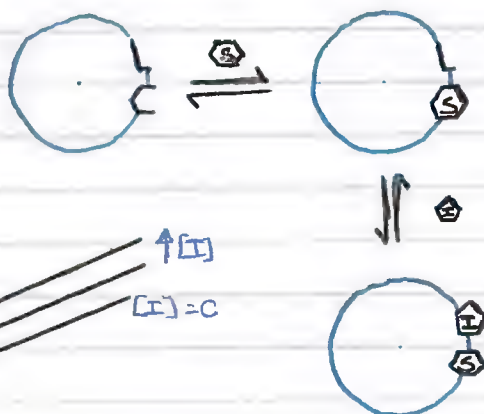
$$K'_M > K_M$$

- Como toda a enzima ligada ao substrato dá produto, então a velocidade é a mesma

$$V'_M = V_M$$

$$K'_M = K_M\left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right)$$

Inibição incompetitiva

$$E + S \rightleftharpoons ES \rightleftharpoons E + P$$
$$+ \; I \; \Updownarrow \; ESI$$

- Existe o consumo de ES pelo que este tem de ser reposto e isso faz aumentar a afinidade, logo

$$K'_M < K_M$$

- Quando temos substrato saturante a equação vai para a direita ligando-se toda a enzima ao substrato
- No entanto, parte do complexo enzima-substrato liga-se ao inibidor não originando o produto, logo

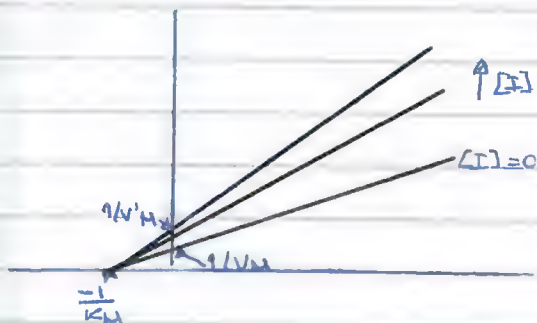
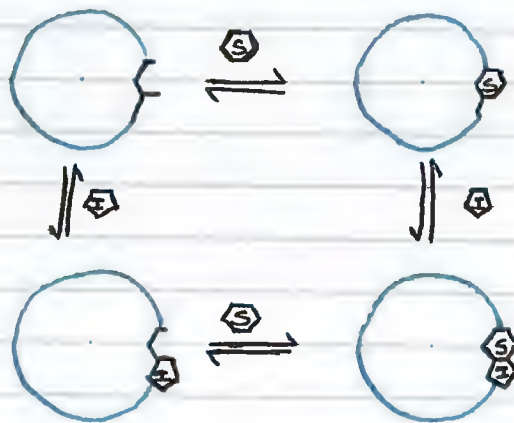
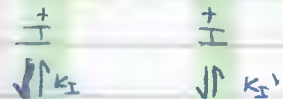
$$V'_M < V_M$$

$V'_M = V_M / \left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right)$ $K'_M = K_M / \left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right)$

Inibição não competitiva

$E + S \rightleftharpoons ES \rightleftharpoons E + P$

$+ I$ (K_I) $+ I$ (K_I')

$EI + S \rightleftharpoons ESI$

- O inibidor tanto pode ligar à enzima livre como ao complexo enzima-substrato, logo

$K_I = K'_I \Rightarrow$ $K'_M = K_M$

- Como nem toda a enzima ligada ao substrato origina produto, então

$$V'_M < V_M$$

$V'_M = V_M / \left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right)$

Resumo:

competitiva - intersecta eixo yy

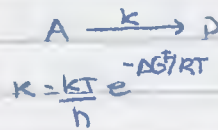
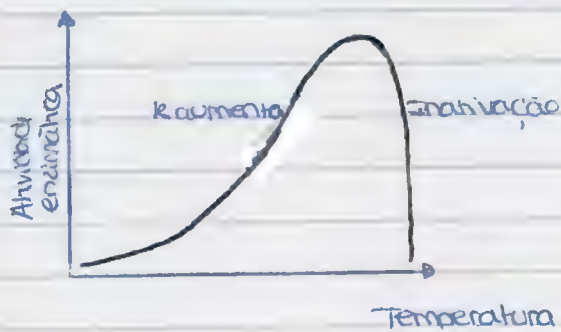
incompetitiva - retas paralelas

não competitiva - intersecta eixo xx

Efeito da temperatura na atividade enzimática

A curva da atividade enzimática em função da temperatura apresenta um máximo que corresponde à temperatura ótima da enzima (varia de enzima para enzima)

$$A \xrightarrow{k} P$$

$$k = \frac{kT}{h} e^{-\Delta G^{\ddagger}/RT}$$

Na região de temperaturas baixas a atividade aumenta exponencialmente de acordo com a lei de Arrhenius.

A temperaturas elevadas a atividade cai abruptamente devido à desnaturação da enzima

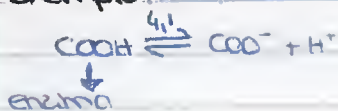
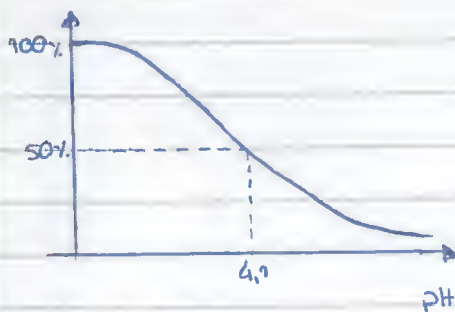
Efeito do pH na atividade enzimática

As proteínas são sensíveis ao pH. A maior parte das enzimas apenas está ativa numa gama relativamente estreita de valores de pH

Certas enzimas podem só estar ativas com o centro ativo possuindo protónios protonados. Nesse caso, o aumento de pH vai levar à desprotonação do aminoácido

Exemplo:

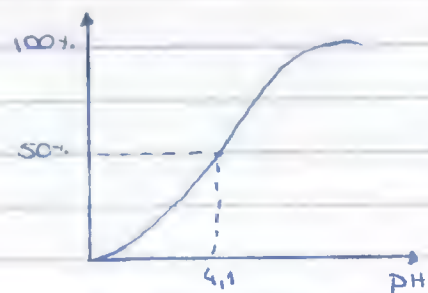
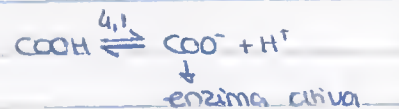
$$COOH \overset{4,1}{\rightleftharpoons} COO^- + H^+$$

↓ enzima ativa (COOH)

para pH = 4,1 , 50% COOH e 50% COO^-

pH = 1 , 100% COOH

pH = 12 , 100% COO^-

$$COOH \overset{4,1}{\rightleftharpoons} COO^- + H^+$$

↓ enzima ativa (COO^-)

para pH = 4,1 , 50% COOH e 50% COO^-

pH = 1 , 100% COO^-

pH = 12 , 100% COOH

- O estudo da dependência da atividade enzimática com o pH pode dar informação acerca dos valores de pKa dos aminoácidos do centro ativo

Bioenergética

Metabolismo

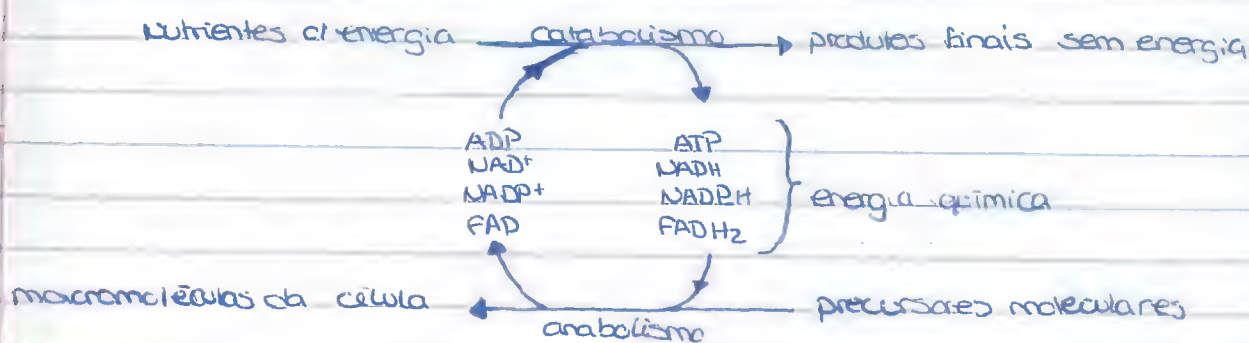
- Os organismos vivos não se encontram em equilíbrio - requerem um input contínuo de energia
- Os sistemas vivos mantêm-se em estado estacionário
- Metabolismo é uma atividade celular altamente coordenada em que vários sistemas multi-enzimáticos (caminhos metabólicos) cooperam para:
  - obter energia a partir do sol ou da degradação de nutrientes do ambiente ricos em energia → bioenergética
  - sintetizar e degradar as biomoléculas necessárias para as funções especializadas da célula (lípidos das membranas, mensageiros intracelulares e pigmentos) → acoplamento de reações exergónicas de oxidação (degradação) de nutrientes aos processos endergónicos para manutenção da célula (movimento, transporte ativo, biossíntese de macromoléculas)

Como é que as células obtêm a energia necessária?

- Anabolismo (ou caminhos metabólicos biossintéticos): síntese de moléculas complexas a partir de componentes mais simples (blocos percursores)
- Catabolismo (ou caminhos metabólicos degradativos): degradação dos nutrientes nos seus componentes constituintes, com (ou para) produção de energia → fornece a energia e as moléculas percursoras usadas no anabolismo

Nutrientes c/ energia —catabolismo→ produtos finais sem energia

ADP, NAD+, NADP+, FAD ⇄ ATP, NADH, NADPH, FADH2 } energia química

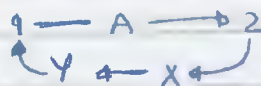
macromoléculas da célula ←anabolismo— precursores moleculares

As vias metabólicas

- Conjunto de reações enzimáticas consecutivas (vias metabólicas lineares ou cíclicas)
↔ Metabólicos

Catabolismo convergente: Uma molécula pode ser formada através de vários compostos e vários processos

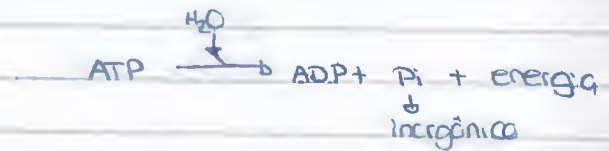
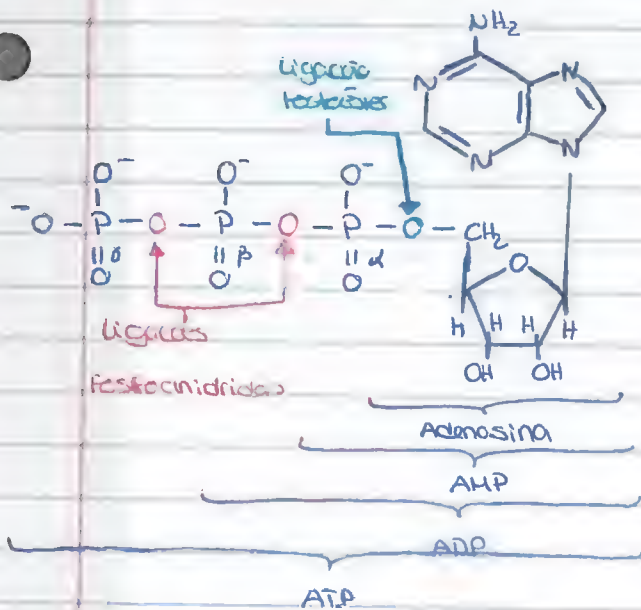
Cíclicos: a molécula existente pode dar origem a si mesma adquirindo e libertando determinados compostos

Anabolismo divergente: um só composto é o percursor de vários processos que irão dar origem a variados compostos

- As vias metabólicas são irreversíveis. A direcionalidade de uma via **metabólica** é determinada pela ocorrência de reações irreversíveis ($\Delta G^0 < 0$) - ocorrência de uma reação irreversível → irreversabilidade de toda a via
- As vias catabólicas e anabólicas são quase sempre distintas
  - A separação é necessária por razões energéticas (ambos têm de ter ΔG globais negativos).
  - Os caminhos anabólicos e **catabólicos** empregam frequentemente enzimas comuns nos passos reversíveis → maior economia
  - A ocorrência de vias de interconversão independentes permite regulação independente

- Todas as vias têm um passo limitante. Apesar das vias serem irreversíveis, a maioria das reações encontra-se perto do equilíbrio; no início das vias há sempre um passo irreversível (exergónico) que obriga ao escoamento dos produtos
- Todas as vias são reguladas. A regulação das vias metabólicas baseia-se na necessidade da célula. A maioria das vias é controlada pela regulação das enzimas que catalizam as reações irreversíveis (regulação dos passos limitantes)
  - A regulação independente é feita nos passos irreversíveis (pontos em que os caminhos divergem) nos quais os enzimas regulatórias são reguladas reciprocamente por efetores alostéricos comuns
- Nas células eucarióticas as vias **metabólicas** ocorrem em diferentes compartimentos celulares → transporte de metabolitos / interdependência metabólicas de orgãos
- As vias metabólicas estão relacionadas entre si e envolvem motivos comuns
  - Reações químicas e metabolitos comuns
  - Sequências de reações comuns
  - Estratégias regulatórias comuns
- **Utilização de ATP como "moeda" energética**

Transportadores ativados

Transportador	Grupo transferido	Vitamina percursora
ATP	fosferila	
NADH e NADPH	eletrões	Niacina (B3)
$FADH_2$ e $FMNH_2$	eletrões	riboflavina (B2)
Tiamina pirofosfato	aldeído	tiamina (B1)
Lipoamida	acilo	
coenzima A	acilo	ácido pantoténico (B5)

ATP

$^-O - P(=O)(O^-) - O - P(=O)(O^-) - O - P(=O)(O^-) - O - CH_2$ – (ribose, OH OH) – adenina (NH_2)

(γ, β, α)

ligação fosfoéster

ligações fosfoanidridas

Adenosina

AMP

ADP

ATP

$$ATP \xrightarrow{H_2O} ADP + P_i + energia$$

P_i → inorgânico

Transportadores de eletrões

[illegible]: transportador de eletrões na oxidação dos nutrientes (catabolismo)

[illegible]: transportador de eletrões na biossíntese (anabolismo)

$$NAD(P)^+ + 2H^+ + 2e^- \rightarrow NAD(P)H + H^+$$

$$AH_2 + NADH \rightarrow A + NADH + H^+$$

$$A + NADPH + H^+ \rightarrow AH_2 + NADP^+$$

AH_2 / A = substrato oxidado / reduzido

Enzimas → Oxidorredutases ou desidrogenases

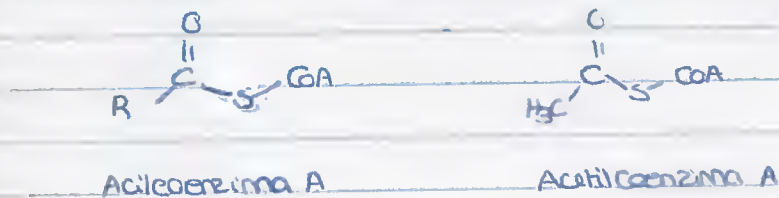
[illegible] transportador de eletrões na oxidação do nutriente

[illegible]

$FAD + 2H^+ + 2e^- \rightarrow FADH_2$

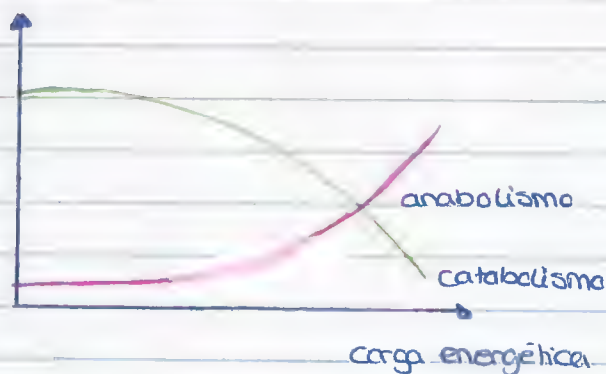
Tiamina pirofosfato (TPP): transportador de grupos aldeído

Lipoamida: transportador de grupos acilo

Coenzima A (CoA): transportador de grupos acilo ativados

Regulação dos processos metabólicos

- A velocidade dos processos degradativos é controlada pelas necessidades da célula em termos de poder redutor ($NADH$, $FADH_2$) e de potencial de fosforilação ($pf = [ATP]/[ADP] \times [P_i]$)
- Formas de regulação:
  1- Regulação da quantidade de enzimas: balanço entre a velocidade de síntese proteica (transcrição e tradução) e a velocidade de degradação das enzimas
  2- Regulação da atividade enzimática
  - controlo alostérico de enzimas em pontos chave dos percursos metabólicos
  - modificação covalente reversível
  3- Acessibilidade dos substratos
  - Transferência de metabolitos entre diferentes compartimentos celulares nas células eucarióticas. A compartimentação permite a indispensável regulação independente de caminhos opostos.

- Em última análise todo o metabolismo é controlado pela energia disponível (carga energética

$$\text{Carga energética (ce)} = \frac{[ATP] + \frac{1}{2}[ADP]}{[ATP] + [ADP] + [AHP]}$$

- O controlo destes caminhos está feito de modo a manter ce dentro de limites apertados ($0,80 < ce < 0,95$)
- Tal como o pH, a ce está "tamponizada" dentro da célula
- Se for necessária energia ativam-se as vias catabólicas para ser produzida.
- Se tiver muita energia ativam-se as vias anabólicas para ser consumida.
- Alternativamente, pode-se utilizar o potencial de fosforilação como critério.
- potencial de fosforilação (pf) = $\frac{[ATP]}{[ADP][P_i]}$

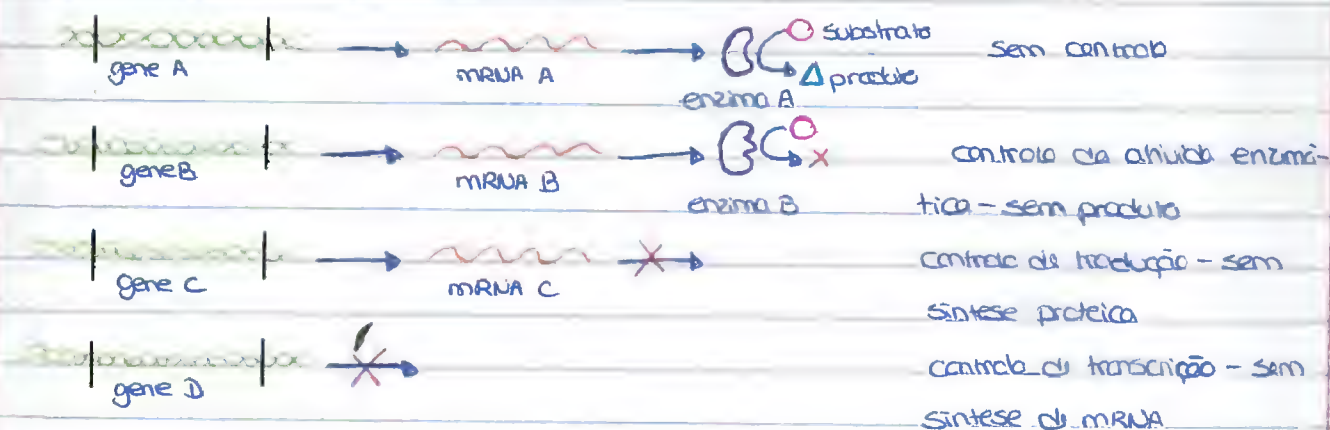
- pf depende de $[P_i]$ e está relacionado com a energia livre que se obtém quando o ATP é hidrolisado nas condições da célula

1 - Controlo da concentração da enzima

gene A → mRNA A → enzima A (substrato → produto) — sem controlo

gene B → mRNA B → enzima B (substrato ✗) — controlo da atividade enzimática - sem produto

gene C → mRNA C ✗→ — controlo da tradução - sem síntese proteica

gene D ✗→ — controlo da transcrição - sem síntese de mRNA

Ocorre um balanço entre a síntese proteica e a velocidade de degradação de enzimas. Caso haja demasiada concentração de enzima ou de produto pode ser usado um dos tipos de controlo acima mencionados.

2- Regulação da atividade enzimática

[illegible]

O controlo alostérico dá-se através da mudança conformacional por ligação de uma molécula fora do centro ativo. Esta mudança afeta a ligação da enzima ao substrato no centro ativo podendo ser um controlo positivo ou negativo da atividade enzimática.

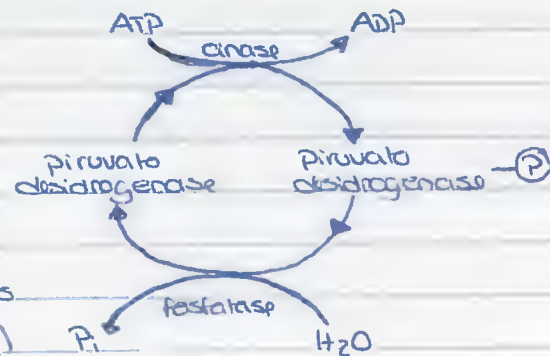
[illegible]

- Uma molécula liga-se covalentemente à enzima não necessitando da existência de subunidades na enzima. Esta ligação afeta a afinidade do substrato à enzima havendo, por isso, regulação enzimática.

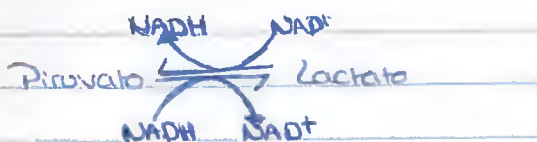
Exemplo: fosforilação/desfosforilação - cinases/fosfatases

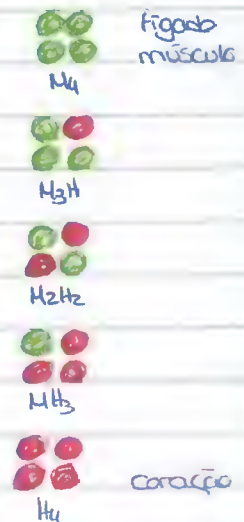
- São as mais comuns
- O grupo fosfato é volumoso e carregado induzindo alterações conformacionais
- Envolvem enzimas cinases e fosfatases
- Piruvato desidrogenase é inativa fosforilada e ativa desfosforilada
- Os aminoácidos com grupos OH são os alvos para esta modificação (serina, treonina, tirosina)

ATP → ADP (cinase)
piruvato desidrogenase → piruvato desidrogenase —Ⓟ
fosfatase: H_2O → P_i

[illegible]

- Formas diferentes da enzima as quais diferem na sequência de aminoácidos embora catalizem a mesma reação.
- Diferem nas suas propriedades cinéticas, distribuição nos tecidos e regulação

Exemplo: lactato desidrogenase (LDH) - Cataliza a conversão de lactato a piruvato

Piruvato ⇌ Lactato
NADH → NAD+
NADH ← NAD+

- Tetrâmero com subunidades H e M
- H4 predominante no músculo cardíaco
- M4 predominante no músculo esquelético e fígado
- H4 inibida alostericamente por altos níveis de piruvato, mas não a M4

M4 — fígado, músculo
M_3H
M_2H_2
MH_3
H4 — coração

- As isoenzimas têm diferentes valores de K_M para o piruvato e estão otimizadas nos diferentes tecidos

- M_4 tem maior K_M existindo em maior quantidade no músculo esquelético que é "anaeróbio"

- H_4 tem menor K_M existindo em maior quantidade no músculo cardíaco que é aeróbio

Ativação proteolítica

Muitas enzimas são sintetizadas com percursores inativos (zimogénios) e são ativadas pela sua quebra proteolítica.

Exemplos:

- Enzimas digestivas (zimogénios sintetizados no estômago e no pâncreas)
- Enzimas de coagulação do sangue (cascata proteolítica de ativação
- Hormonas (cascatas reguladas hormonalmente)

Energia Livre de Gibbs

$aA + bB \rightleftharpoons cC + dD$

ΔG - variação da energia livre para uma reação catalisada enzimaticamente

$$\Delta G = \Delta G^0 + RT \ln \frac{[C]^c[D]^d}{[A]^a[B]^b}$$

ΔG^0 - variação de energia livre em cond. padrão

$[prod] = [reag] = 1M$

$T = 25°C$ (298K)

$P = 1 atm$

$R = 1,987 \times 10^{-3}$ kcal.mol^{-1}.K^{-1}

$$K_{eq} = \frac{[C]^c[D]^d}{[A]^a[B]^b} \Rightarrow \Delta G = \Delta G^0 + RT \ln K_{eq}$$

Convenção FQ - substâncias puras a pH=0
ΔG^0

Convenção Bq - substâncias puras a pH=7
$\Delta G^{0'}$

$$\Delta G' = \Delta G^{0'} + RT \ln K'_{eq}$$

Critério de espontaneidade de uma reação

$\Delta G'$ - dependente de [produtos], [reagentes] e T

$\Delta G' > 0$ - Reação endergónica (reação ocorre no sentido inverso)

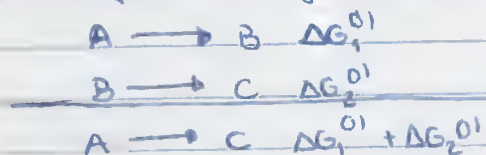
$\Delta G' < 0$ - Reação exergónica (reação ocorre no sentido direto)

$\Delta G' = 0$ - Reação no equilíbrio

$\Delta G^{0\prime} = -RT \ln K'_{eq}$
↓
energia livre padrão

As variações de energia livre são aditivas

$A \longrightarrow B \quad \Delta G_1^{0\prime}$
$B \longrightarrow C \quad \Delta G_2^{0\prime}$

$A \longrightarrow C \quad \Delta G_1^{0\prime} + \Delta G_2^{0\prime}$

Compostos fosforilados de alta e baixa energia

Bases químicas para variação da energia livre resultante da hidrólise do ATP:

1- A hidrólise provoca uma separação de cargas aliviando a repulsão eletrostática entre as 4 cargas negativas do ATP

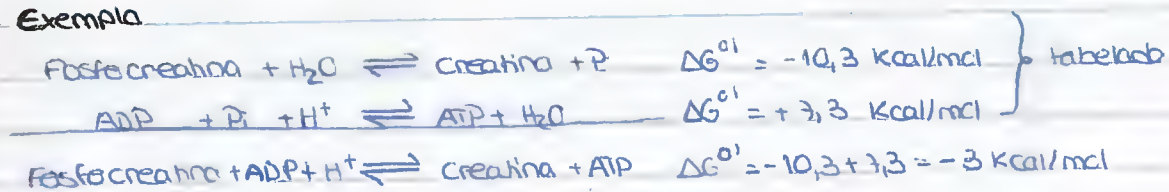
2- O fosfato inorgânico (P_i) libertado é estabilizado por formas de ressonância

3- O ADP ioniza-se libertando um protão para o meio de baixa $[H^+]$ (pH 7)

O ATP é usado nos processos anabólicos e produzido nos processos catabólicos. Um composto fosforilado (como o ATP) quando sofre hidrólise perde um grupo fosfato e liberta energia (uns mais que outros). Assim, $\Delta G^{0} < 0$ uma vez que os produtos são mais estáveis que os reagentes por haver menor repulsão de cargas, aumento da entropia ou maior número de híbridos de ressonância que o estabilizam.

Exemplo

Fosfocreatina $+ H_2O \rightleftharpoons$ creatina $+ P_i$ $\quad \Delta G^{0\prime} = -10,3$ kcal/mol } tabelado
ADP $+ P_i + H^+ \rightleftharpoons$ ATP $+ H_2O$ $\quad \Delta G^{0\prime} = +7,3$ kcal/mol

Fosfocreatina + ADP + $H^+ \rightleftharpoons$ creatina + ATP $\quad \Delta G^{0\prime} = -10,3 + 7,3 = -3$ kcal/mol

Concentrações típicas nas células musculares em repouso:

[ATP] = 4 mM
[ADP] = 0,013 mM
[fosfocreatina] = 25 mM
[creatina] = 13 mM
$R = 1,987 \times 10^{-3}$ kcal.mol^{-1}.K^{-1}
$T = 37\,°C = 37 + 273,15\ K = 310,15\ K$

$$\Delta G' = \Delta G^{0\prime} + RT \ln\left(\frac{[\text{creatina}][\text{ATP}]}{[\text{fosfocreatina}][\text{ADP}]}\right)$$

$$= -3 + 1,987 \times 10^{-3} \times 310,15 \times \ln \frac{13 \times 4}{25 \times 0,013}$$

$$= -3 + 0,616 \cdot \ln 160$$

$$= -3 + 0,616 \times 5,08$$

$$= -3 + 3,129 = 0,129 \text{ kcal/mol}$$

Reações biológicas de oxidação redução

- Os eletrões armazenados são a forma de poder redutor nos compostos NADH, NADPH e $FADH_2$ são transferidos para espécies com maior afinidade para os eletrões produzindo energia (ATP)

Diferentes formas de produção de ATP

- Fotofosforilação
- Fosforilação a nível do substrato: o fosfato é retirado de outro reagente (substrato fosfato) para se adicionar ao ADP e formar o ATP
- Fosforilação oxidativa: ocorre a transferência de eletrões para se juntar o fosfato ao ADP e formar ATP sem ser usado qualquer substrato

Potenciais de redução (medida de afinidade para eletrões)

- Os potenciais de redução são medidos relativamente ao elétrodo padrão de hidrogénio (H_2) ao qual foi por convenção atribuído o valor 0V a pH = 0. O valor do potencial de redução padrão do elétrodo de H_2 a pH = 7 é −0,414V sendo designado por $\varepsilon^{0'}$
- O potencial de redução de uma solução (ε) depende não só das espécies químicas presentes mas também a sua concentração

Equação de Nernst: relaciona o potencial de redução de uma solução (ε) com o potencial de redução padrão ($\varepsilon^{0'}$) e a concentração das espécies oxidada e reduzida

$$\varepsilon' = \varepsilon^{0'} - \frac{RT}{nF} \ln \left(\frac{[\text{dador de } e^-]}{[\text{aceitador } e^-]} \right)$$

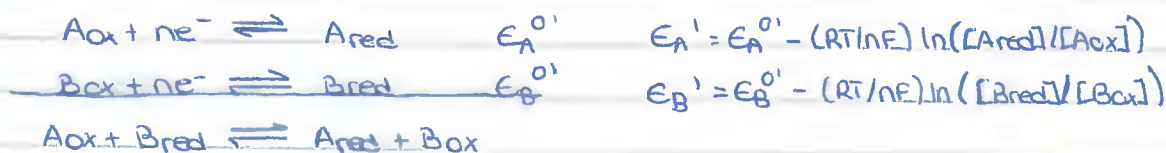
$R = 1{,}987 \times 10^{-3}$ kcal.mol^{-1}.K^{-1}

n = eletrões trocados

F = constante de Faraday (23,06 kcal V^{-1} mol^{-1})

Os potenciais de redução podem ser usados para calcular a variação da energia livre

$$A_{ox} + ne^- \rightleftharpoons A_{red} \qquad \varepsilon_A^{0'} \qquad \varepsilon_A' = \varepsilon_A^{0'} - (RT/nF)\ln([A_{red}]/[A_{ox}])$$

$$B_{ox} + ne^- \rightleftharpoons B_{red} \qquad \varepsilon_B^{0'} \qquad \varepsilon_B' = \varepsilon_B^{0'} - (RT/nF)\ln([B_{red}]/[B_{ox}])$$

$$A_{ox} + B_{red} \rightleftharpoons A_{red} + B_{ox}$$

$$\Delta\varepsilon' = \Delta\varepsilon^{0'} - \frac{RT}{nF} \ln \left(\frac{[A_{red}][B_{ox}]}{[A_{ox}][B_{red}]} \right) \qquad \Delta G' = \Delta G^{0'} - RT \ln \left(\frac{[A_{red}][B_{ox}]}{[A_{ox}][B_{red}]} \right)$$

$$\Delta G' = -nF\Delta\varepsilon'$$

$$\Delta G^{0'} = -nF\Delta\varepsilon^{0'}$$

$\Delta E' > 0$ – Reação exergónica (ocorre no sentido direto)
$\Delta E' < 0$ – Reação endergónica (ocorre no sentido inverso)
$\Delta E' = 0$ – Reação no equilíbrio

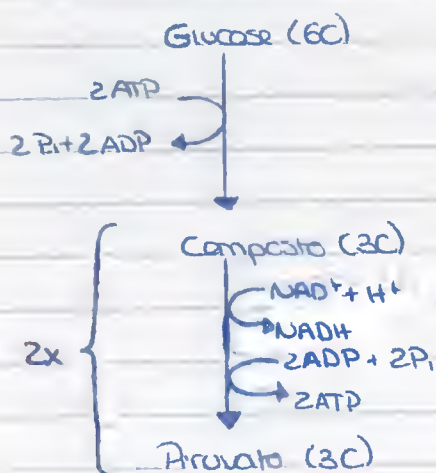
$$A_{ox} + B_{red} \rightleftharpoons A_{red} + B_{ox}$$

$E_A^{0'} > E_B^{0'}$ $\quad \Delta E^{0'} = E_A^{0'} - E_B^{0'}$ $\quad \Delta E^{0'} = E^{0'}_{aceitador} - E^{0'}_{dador}$

Glicólise

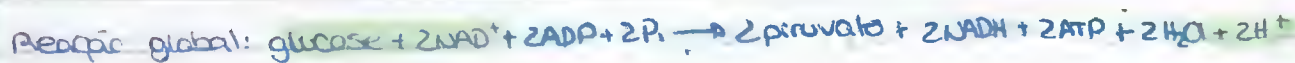
Glicólise

- A glicólise dá-se no citoplasma de algumas células, nomeadamente células cerebrais, músculos esqueléticos e eritrócitos

Glucose (6C)
2 ATP → 2 P_i + 2 ADP
Composto (3C)
2x: $NAD^+ + H^+$ → NADH; 2 ADP + 2 P_i → 2 ATP
Piruvato (3C)

enzimas cinase – em reações onde há formação ou consumo de ATP

enzimas desidrogenase – catalisam reações de oxidação - redução (formação / consumo de NADH)

A BPG é formada durante a glicólise nos eritrócitos. Se houver deficiência em hexocinase vai haver maior afinidade para o O_2 por haver menos BPG (o contrário acontece para a piruvato cinase)

Reação global: glucose + 2 NAD^+ + 2 ADP + 2 P_i → 2 piruvato + 2 NADH + 2 ATP + 2 H_2O + 2 H^+

- A glicólise é um processo catabólico uma vez que de um composto mais complexo (com 6 carbonos) chegamos a um composto mais simples (com 3 carbonos) além de que se dá a libertação de energia (ATP e NADH)

Objetivos e estratégias da glicólise

- Objetivos: produção de energia e de intermediários para a biossíntese
- Estratégias químicas:

1- Fosforilação dos intermediários:

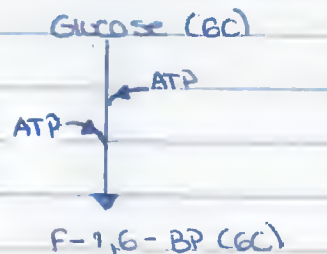
- Carga negativa impede saída da célula → não há difusão através da membrana (não é necessário gastar energia para manter os compostos no interior da célula)
  - G → G6P permite manter o gradiente de concentração

- Os grupos fosforilo ativados são muito importantes na conservação de energia metabólica
- A presença de grupos fosfato aumenta a especificidade das enzimas. Os centros ativos são específicos para os complexos Mg^{2+} - nucleótidos (ATP e ADP)

2- Intermediários fosforilados são convertidos em compostos com elevado potencial de transferência de grupo fosforilo

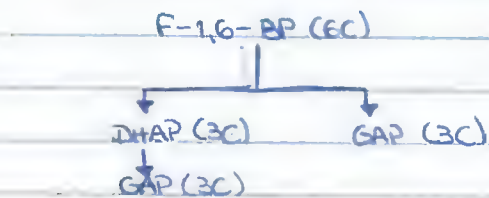
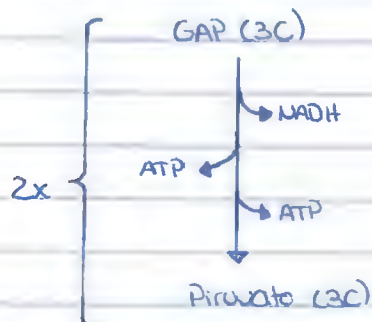
3- Reações exergónicas são acopladas com a síntese de ATP por fosforilação a nível do substrato

Fases da glicólise

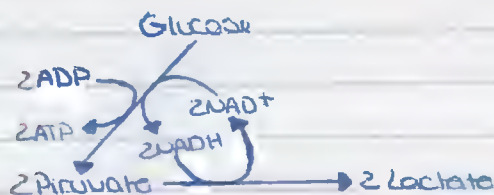
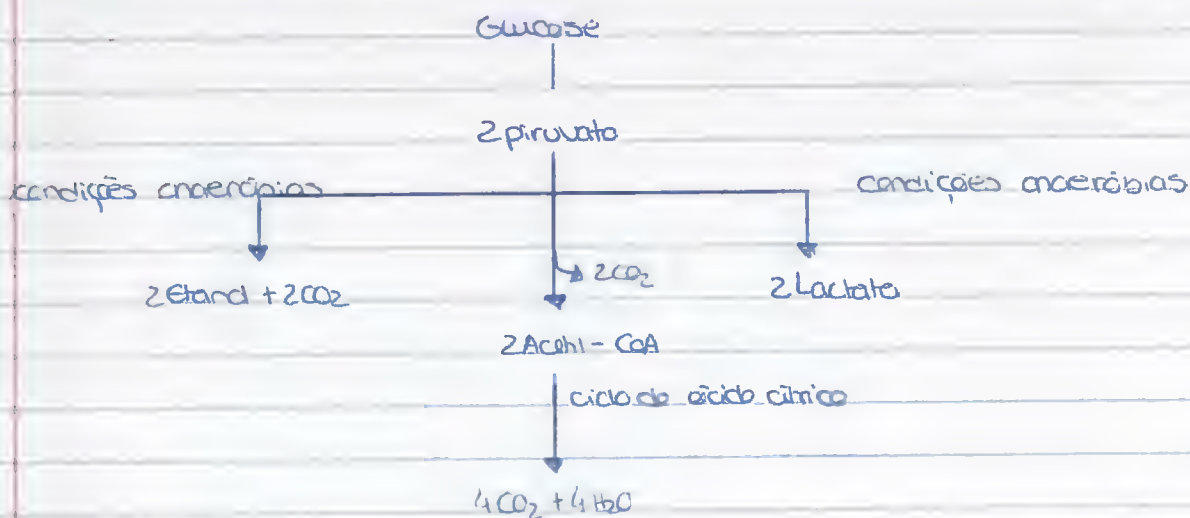
1ª [illegible]: A glucose é capturada e destabilizada (consumo de 2ATP)

[illegible] O açúcar de 6 carbonos é convertido em duas unidades de 3 carbonos

F-1,6-BP (6C)

DHAP (3C) GAP (3C)

GAP (3C)

[illegible]: Conversão de GAP em piruvato com produção de 4 ATP

Fermentação Láctica

- A fermentação láctica é um processo que se dá nas células dos músculo esqueléticos quando estes estão em esforço e já não existe oxigénio suficiente para tornar sustentável a cadeia de transporte eletrónico mitocondrial.
- A fermentação láctica é a transformação de glucose em lactato (pH 7).
- Na ausência de oxigénio o NAD^+ é regenerado pela redução do piruvato a lactato. É uma maneira de obtenção de energia na ausência de oxigénio.

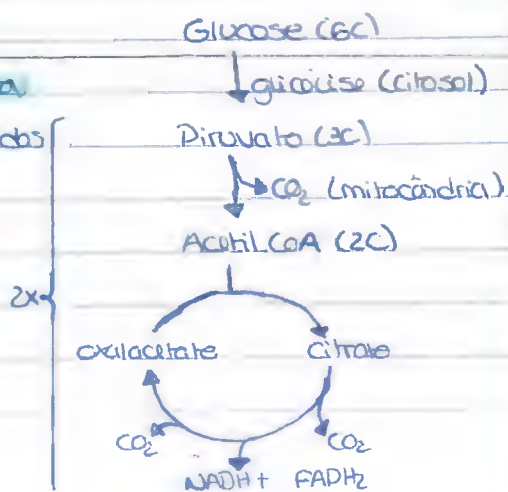
$$Glucose + 2ADP + 2P_i \longrightarrow 2\,Lactato + 2ATP + 2H_2O + 2H^+$$

Destino do produto final da glicólise

O ciclo de Krebs

É o caminho final comum para oxidação completa das moléculas que fornecem energia (açúcares, ácidos gordos, aminoácidos):

1. A oxidação de ácidos gordos, glucose e alguns aminoácidos conduzem à produção de Acetil CoA (forma ativada do acetato)

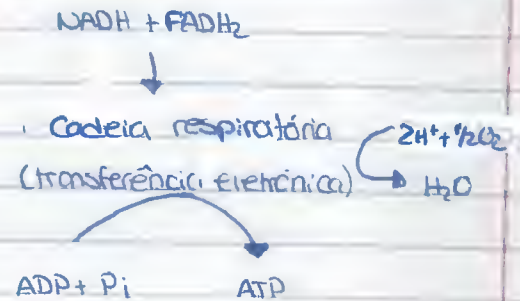
Glucose (6C)
↓ glicólise (citosol)
Piruvato (3C)
↓ CO_2 (mitocôndria)
Acetil CoA (2C)

2x

oxaloacetato → citrato
CO_2, CO_2
NADH + FADH2

2. A conversão do piruvato em Acetil CoA e CO_2 é efetuada através de reações de descarboxilação e desidrogenação (descarboxilação oxidativa).

3. A oxidação dos grupos acetil no ciclo de Krebs conduz à formação de poder redutor (NADH e $FADH_2$), GTP/ATP e CO_2.

4. Os eletrões transportados pelo NADH e $FADH_2$ são transferidos para a cadeia de transporte eletrónico reduzindo no final O_2 a H_2O e levando à síntese de ATP.

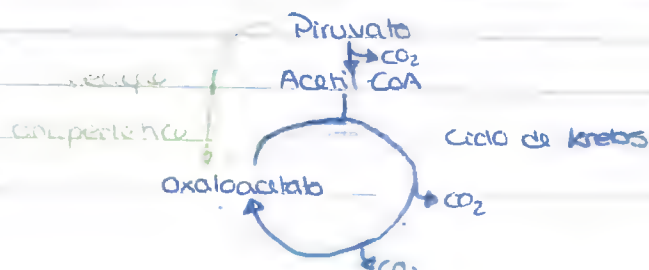
NADH + $FADH_2$
↓
Cadeia respiratória (transferência eletrónica) — $2H^+ + \frac{1}{2}O_2$ → H_2O
ADP + Pi → ATP

Cadeia respiratória: Reoxidação dos cofatores reduzidos, NADH e $FADH_2$, numa sequência de reações de transferência eletrónica em que o oxigénio é o aceitador final. A energia libertada é utilizada para formar ATP (fosforilação oxidativa)

Objetivos

- Oxidação completa de 2 carbonos para obtenção de energia (GTP, NADH, e $FADH_2$)
- Formação de percursores para a biossíntese (aminoácidos, bases aromáticas, colesterol, porfirinas)
- O O_2 não intervém diretamente nas reações do ciclo, mas é necessário para reoxidar as moléculas de NADH e $FADH_2$ → o ciclo do ácido cítrico só funciona em condições aeróbias.
- O ATP é formado na cadeia respiratória como resultado da reoxidação dos cofatores reduzidos (NADH e $FADH_2$)

O caráter anfibólico do ciclo de Krebs

- No ciclo de Krebs dá-se a oxidação completa da Acetil CoA com formação de energia pelo que o processo é uma via catabólica
- No entanto, durante o ciclo formam-se alguns compostos que são utilizados na biossíntese de outros compostos tendo, por isso, um caráter anabólico
- Dadas estas características do ciclo de Krebs podemos denominar este processo como um conjunto de reações anfibólicas
- Existem também reações exteriores ao ciclo que permitem a reposição dos intermediários do mesmo denominadas reações anapleróticas

Exemplo:

Localização do ciclo de krebs

- O ciclo de krebs ocorre na matriz mitocondrial

Nutrientes

citoplasma — Glucose → glicólise → 2 ATP → Piruvato (NAD^+ / NADH) → Fermentação

mitocôndria — Acetil CoA → Ciclo krebs → 2 ATP → O_2 → Cadeia resp → 26 ATP; H_2O

Formação de acetil CoA

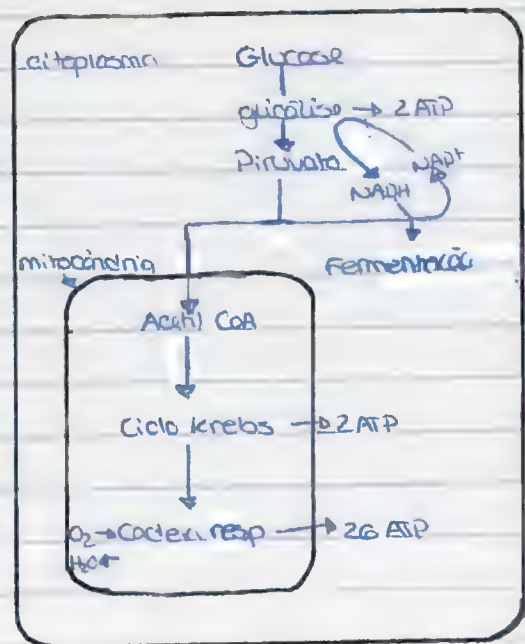
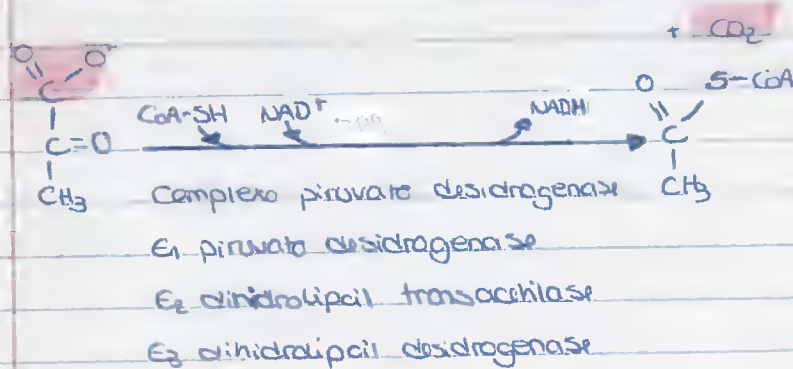
- O complexo multienzimático piruvato desidrogenase (PDH) catalisa a descarboxilação oxidativa do piruvato a acetato (reacção irreversível) por remoção de CO_2 com formação de NADH. Nos animais acetil-CoA **não** pode ser convertido em glucose

$CH_3-C(=O)-COO^-$ + CoA-SH + NAD^+ → (Complexo piruvato desidrogenase) → $CH_3-C(=O)-S-CoA$ + NADH + CO_2

E_1 piruvato desidrogenase

E_2 di-hidrolipoil transacetilase

E_3 di-hidrolipoil desidrogenase

$$\text{Piruvato} + \text{CoA} + NAD^+ \longrightarrow \text{acetil-CoA} + CO_2 + NADH$$

Balanço energético do ciclo de Krebs

$$\text{Acetil-CoA} + 3NAD^+ + FAD + GDP + P_i + 2H_2O \rightarrow 2CO_2 + 3NADH + 3H^+ + FADH_2 + GTP + CoA + 2H^+$$

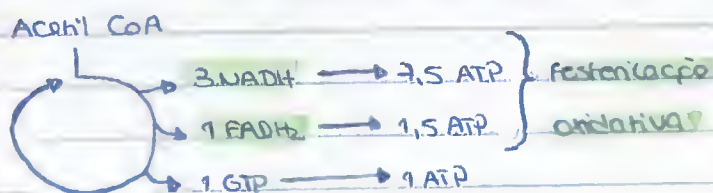
Acetil CoA

- 3 NADH → 7,5 ATP
- 1 $FADH_2$ → 1,5 ATP
- 1 GTP → 1 ATP

} fosforilação oxidativa

Nota:

1 NADH → 2,5 ATP

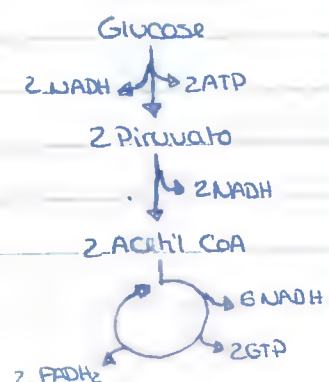
1 $FADH_2$ → 1,5 ATP

Cada unidade de acetato dá origem a 10 ATP

Glucose → CO_2 : balanço energético

- Os cofatores reduzidos, NADH e $FADH_2$, são reoxidados na cadeia respiratória; a energia produzida é aproveitada para formar ATP por fosforilação oxidativa

10 NADH → 25 ATP

2 $FADH_2$ → 3 ATP

Glucose → 2 NADH, 2 ATP → 2 Piruvato → 2 NADH → 2 Acetil CoA → 6 NADH, 2 GTP, 2 $FADH_2$

- Balanço global: 1 glucose → 6 CO_2
  28 ATP (fosforilação oxidativa)
  4 ATP (fosforilação a nível do substrato)

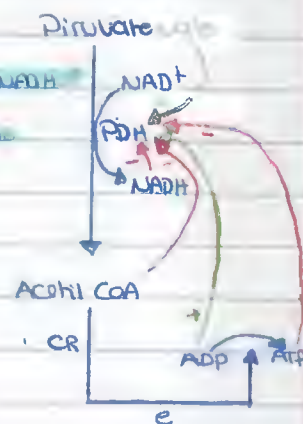
- Em condições aeróbias formam-se 32 ATP na oxidação completa duma molécula de glicose (anaeróbias - 2 ATP)

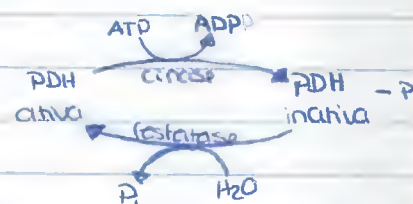
Regulação

Piruvato desidrogenase (PDH)

- O complexo piruvato desidrogenase é:
  1. regulado alostericamente: inibido pelos produtos da reacção, acetil CoA e NADH
  2. inibido quando a carga energética é elevada e os intermediários para a biossíntese abundantes
  3. inibido por modificação covalente; por fosforilação

Piruvato → PDH (NAD^+ → NADH) → Acetil CoA → CK (ADP, ATP)

PDH ativa → (ATP → ADP, cinase) → PDH inativa – P; PDH inativa → (fosfatase, H_2O → P_i) → PDH ativa

Ciclo de Krebs

- O ciclo do ácido cítrico é controlado em vários pontos (reacções irreversíveis):
  1. Isocitrato desidrogenase: ativação alostérica por ADP e inibição por NADH e ATP
  2. α-cetoglutarato desidrogenase: inibição por succinilCoA, NADH e ATP
  3. Em muitas bactérias a entrada no ciclo é controlada:
     - Citrato sintase: inibição alostérica por ATP (aumenta K_M para acetil CoA)

Coordenação da glicólise e do ciclo de Krebs

- Em condições normais as velocidades da glicólise e do ciclo de Krebs estão controladas pelos níveis de ATP e NADH, componentes comuns aos dois caminhos, e também pela concentração de citrato que é um inibidor da fosfofrutocinase (enzima que catalisa o passo limitante da glicólise)

[ATP]/
[NADH]/[NAD^+]

[citrato]↑ inibe a glicólise e estimula a gluconeogénese

Respiração

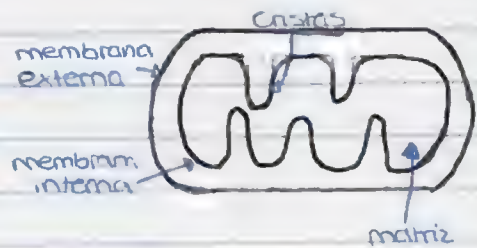
Fosforilação oxidativa

- Ocorre na membrana interna da mitocôndria

Anatomia da mitocôndria

- Membrana externa: permeável a pequenas moléculas e iões (baixa seletividade)
- Membrana interna: impermeável à maioria das moléculas pequenas e iões (incluindo H^+). Permeável a O_2, CO_2 e H_2O (alta seletividade) 75% da massa membranar

formada por proteínas para transporte eletrônico e para ADP, ATP, piruvato, P_i e Ca^{2+}

- Matriz mitocondrial: possui as enzimas do ciclo de Krebs e muitas outras

A cadeia de transporte eletrônica

- A cadeia de transporte de eletrões envolve 4 complexos multienzimáticos membranares (complexos I a III) e transportadores móveis (Q e citocromo c) entre os complexos, que são responsáveis pelo transporte de eletrões e formação de um gradiente protónico, e ainda um 5º complexo (complexo V) responsável pela dissipação do gradiente de protões formado e síntese de ATP.
- O complexo II está fisicamente ligado ao ciclo de Krebs (succinato-Q redutase); os outros complexos são bombas de protões
- A coenzima Q é transportadora de 2 eletrões e 2 protões, lipossolúvel
- O citocromo C é uma pequena proteína com grupo heme, transporta 1 eletrão e é solúvel em água

Os transportadores de eletrões

- Os transportadores de eletrões da cadeia respiratória mitocondrial são, maioritariamente, proteínas membranares

Em cada complexo os eletrões são transferidos por cofatores. À exceção do NAD^+ e da coenzima Q, todos os cofatores encontram-se covalentemente ligados às suas apoproteínas

Para além do NAD^+, FAD e FMN, a cadeia respiratória envolve mais 4 tipos de transportadores de eletrões:

1. Ubiquinona (Coenzima Q ou Q: benzoquinona lipossolúvel (hidrofóbica) constituída por um nº variável de isoprenos. Nas quinonas as reações de transferência de eletrões estão acopladas à transferência de protões $[2\times(H^+ + 1e^-)]$ → permite gerar o gradiente de protões à custa do transporte eletrónico

2. Citocromos (Fe^{2+}/Fe^{3+})

3. Proteínas de Ferro-enxofre (FeS): o ferro pode estar Fe^{3+} ou Fe^{2+}

4. Proteínas de cobre

Entrada de eletrões na cadeia respiratória

- A entrada de eletrões na cadeia de transporte eletrónico mitocondrial ocorre, sempre via um cofator flavínico (FAD e FMN)

Reações catalizadas pelos complexos

- Complexo I (principal ponto de entrada de eletrões na cadeia respiratória

$$NADH + CoQ\,(ox) \rightarrow NAD^+ + CoQ\,(red)$$

- Complexo II (segundo ponto de entrada de eletrões na cadeia respiratória, contém a enzima succinato desidrogenase, a única enzima membranar do ciclo de krebs)

$$FADH_2 + CoQ\,(ox) \rightarrow FAD + CoQ\,(red)$$

- Complexo III

$$CoQ\,(red) + cit\,c\,(ox) \rightarrow CoQ\,(ox) + cit\,c\,(red)$$

- Complexo IV

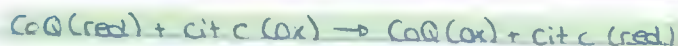
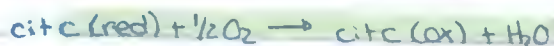
$$cit\,c\,(red) + \tfrac{1}{2}O_2 \rightarrow cit\,c\,(ox) + H_2O$$

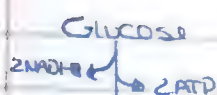
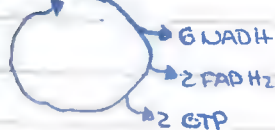
Resumo:

NADH → complexo I → Quinonas

$FADH_2$ → complexo II → Quinonas

Quinonas → complexo III → citocromo c

citocromo c → complexo IV → O_2

Contagem de ATP formado na oxidação completa da glucose

Glucose
2NADH ← → 2ATP
2 Piruvato
→ 2NADH
2 acetil CoA
→ 6NADH
→ 2 $FADH_2$
→ 2 GTP

	nº de ATP
glicólise	
2 ATP →	2
2 NADH →	5 (ou 3)
2 piruvato → 2 acetil CoA	
2 NADH →	5
ciclo de krebs	
6 NADH →	15
2 $FADH_2$ →	3
2 GTP →	2

Total: 32 (ou 30)

Transportes de NADH citoplasmático

- A membrana interna da mitocondria é impermeável ao NADH. Como tal o NADH tem de ser transportado por uma via indireta que pode envolver um de dois transportes:

1. Transportador malato - aspartato (fígado, rim, [illegible])

- O NADH citoplasmático transfere os dois eletrões para o oxaloacetato originando malato. Este é transportado pelo transportador malato-α-cetoglutarato para a matriz mitocondrial. Aí transfere os dois eletrões para o NAD^+ e o NADH resultante é oxidado pela cadeia respiratória.
- Neste caso, 1 NADH citoplasmático origina 2,5 ATP.

[illegible]

O NADH citoplasmático transfere os dois eletrões para a dihidroxiacetona-fosfato. A enzima glicerol-3-fosfato desidrogenase ligada à membrana interna da mitocondria recebe na coenzima FAD os dois eletrões do glicerol-3-fosfato cedendo-os, em seguida, à ubiquinona.

- Neste caso, 1 NADH citoplasmático origina 1,5 ATP

A energia associada ao transporte de eletrões

- Por cada par de eletrões transferidos para o O_2, 10 H^+ são bombeados para o espaço intermembranar

$$NADH + 11 H^+_N + \frac{1}{2} O_2 \longrightarrow NAD^+ + 10 H^+_P + H_2O$$

$$\Delta G = RT \ln\left(\frac{C_2}{C_1}\right) + ZF\Delta\Psi$$

Energia química ΔpH resultante da diferente concentração de uma espécie

potencial de membrana $\Delta\Psi$ resultante da separação de carga através da membrana

- $C_2 > C_1$, Z é o valor absoluto da carga (1 para um protão), $\Delta\Psi$ é a diferença de potencial elétrico transmembranar

$$\ln\left(\frac{C_2}{C_1}\right) = 2,3\left(\log[H^+]_P - \log[H^+]_N\right) = 2,3(pH_P - pH_N) = 2,3\,\Delta pH$$

$$\Delta G = 2,3RT\,\Delta pH + F\Delta\Psi$$

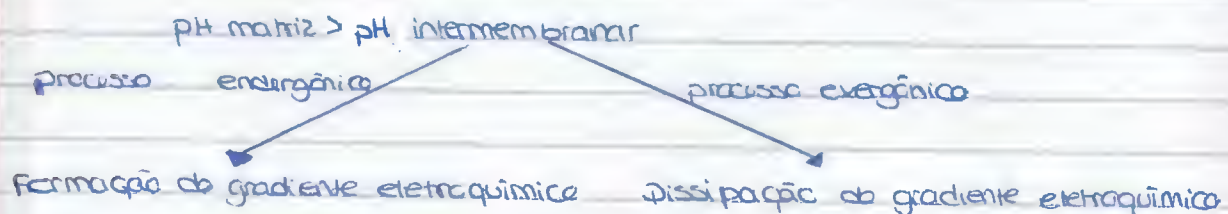
- A energia dos eletrões é convertida num gradiente eletroquímico de protões (força protomotriz) que é usado para a síntese de ATP (a partir de ADP + P_i) e para o transporte ativo de metabolitos e iões através da membrana interna da mitocôndria.

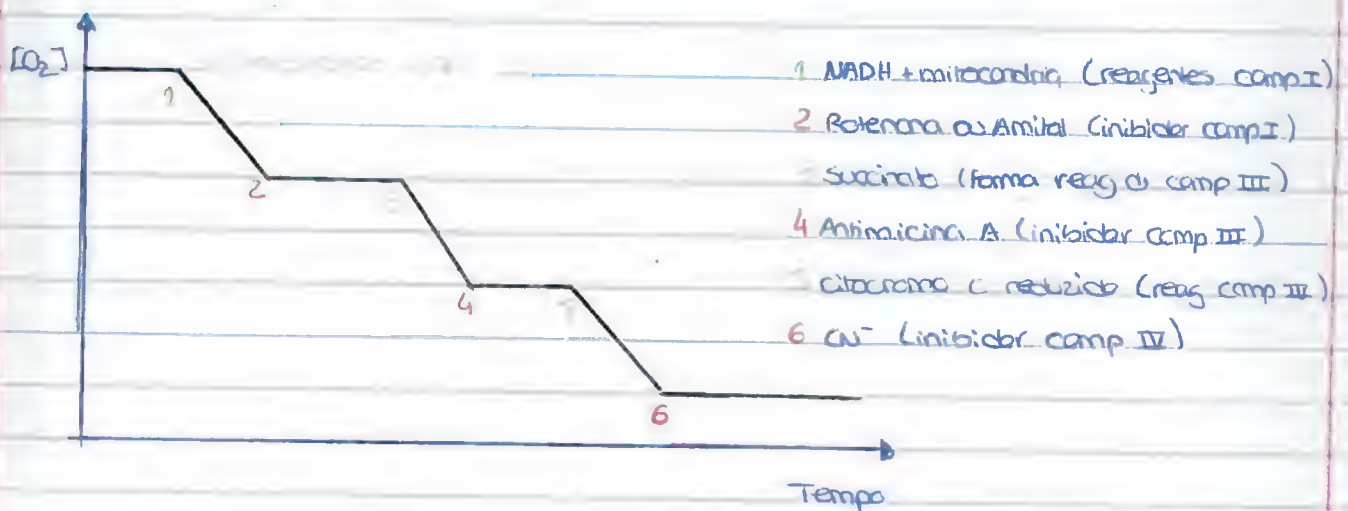
Fosforilação oxidativa (Teoria Quimiosmótica - De Mitchell)

- Os eletrões do NADH e de outros substratos oxidáveis passam através de uma série de transportadores eletrónicos localizados na membrana interna da mitocôndria. Acoplado a este fluxo de eletrões existe transferência de protões através da membrana.
- O gradiente eletroquímico resultante é utilizado para formar ATP pela ATPsintetase. Dada a impermeabilidade da membrana interna aos protões estes retornam à matriz mitocondrial através de canais específicos existentes na sub-unidade F_0 da ATPsintetase. Este fluxo de protões gera energia que conduz à síntese de ATP na sub-unidade F_1 da ATP sintetase.

pH matriz > pH intermembranar

processo endergónico → Formação do gradiente eletroquímico

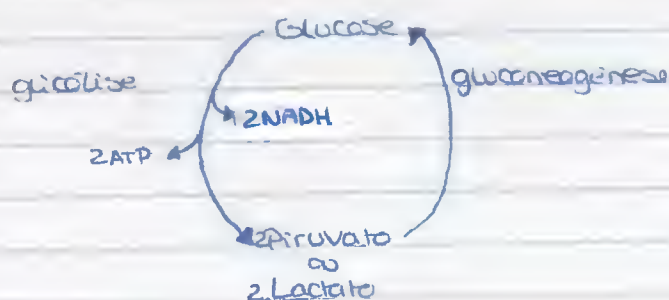
processo exergónico → Dissipação do gradiente eletroquímico

Transdução de energia: converter energia dos eletrões num gradiente de protões

Inibição na cadeia respiratória

A fosforilação oxidativa é regulada pela carga energética

- Se a carga energética é elevada, a velocidade de transporte eletrónico baixa e a concentração de cofatores oxidados (NAD^+ e FAD) baixa → diminuição da velocidade do ciclo de Krebs
  - Acumulação de citrato → inibição da glicólise
  - Acumulação de acetil CoA → ativação da piruvato carboxilase / gluconeogenese
    ↓
- Se houver excesso de energia, o sistema reage ativando a biossíntese de hidratos de carbono e de ácidos gordos, isto é, armazena energia

Glicólise e Gluconeogénese

Gluconeogénese

- Objetivo: manter os níveis de glucose no sangue para o cérebro, eritrócitos e músculos (ativos), ocorre no fígado (e rins) → síntese de glucose e de outros hidratos de carbono a partir do piruvato (ou compostos análogos de 3C, tais como lactato, glicerol ou alanina)
- Processo importante porque o cérebro depende da glucose (120 g/dia dos 160 g/dia totais necessários). As reservas de glucose no organismo (glicogénio 190 g + fluidos corporais 20g) chegam para cerca de 1 dia

- Na gluconeogénese o piruvato é convertido em glucose. A gluconeogénese não é o inverso da glicólise → os passos irreversíveis da glicólise são contornados:

1. O piruvato é convertido em fosfoenolpiruvato passando por oxaloacetato (enzimas piruvato carboxilase e fosfoenolpiruvato carboxicinase)

Piruvato —carboxilase (ATP → ADP + P_i)→ Oxaloacetato —carboxicinase (GTP → GDP)→ fosfoenolpiruvato

2. Frutose-6 fosfato é formada a partir de frutose-1,6-bifosfato por hidrólise de um éster fosfatado no carbono 1 (enzima frutose-1,6 bifosfatase

$$\text{Frutose 1,6-bifosfato} + H_2O \longrightarrow \text{Frutose 6-fosfato} + P_i$$

3. Glucose é formada a partir de glucose 6-fosfato (enzima glucose 6-fosfatase)

Estratégia

- A enzima piruvato carboxilase existe na mitocôndria, as restantes enzimas da gluconeogénese encontram-se no citoplasma (com exceção da enzima glucose 6-fosfatase que está associada à membrana do retículo)

O transporte de malato da mitocôndria para o citosol e a sua reconversão em oxaloacetato servem para transferir NADH para o citosol (onde a razão [NADH]/[NAD+] é muito mais baixa) que depois será usado na conversão de 1,3-bifosfoglicerato em gliceraldeído-3-fosfato

A conversão de piruvato em fosfoenolpiruvato ($\Delta G^{\circ} = +31$ kJ/mol para a reação inversa da que ocorre na glicólise) torna-se possível devido ao gasto de uma molécula de ATP para ativar e ligar o CO_2, com formação de oxaloacetato; a descarboxilação e a fosforilação posteriores (com gasto de GTP) possibilitam a formação do enol instável. A conversão de piruvato em fosfoenolpiruvato na gluconeogénese (2 passos) tem $\Delta G^{\circ} = +0{,}8$ kJ/mol

PEP ← CO_2 ← Oxaloacetato ← (NADH / NAD^+) ← Malato | citoplasma / mitocôndria | Malato ← (NAD^+ / NADH) ← Oxaloacetato ← CO_2 ← Piruvato ← Piruvato

PEP ← CO_2 ← Oxaloacetato ← CO_2 ← Piruvato ← Piruvato ← (NADH / NAD^+) ← Lactato

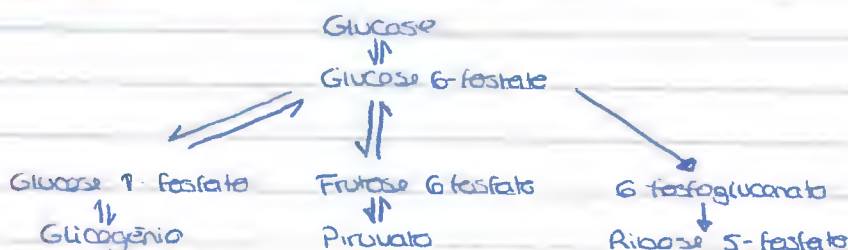
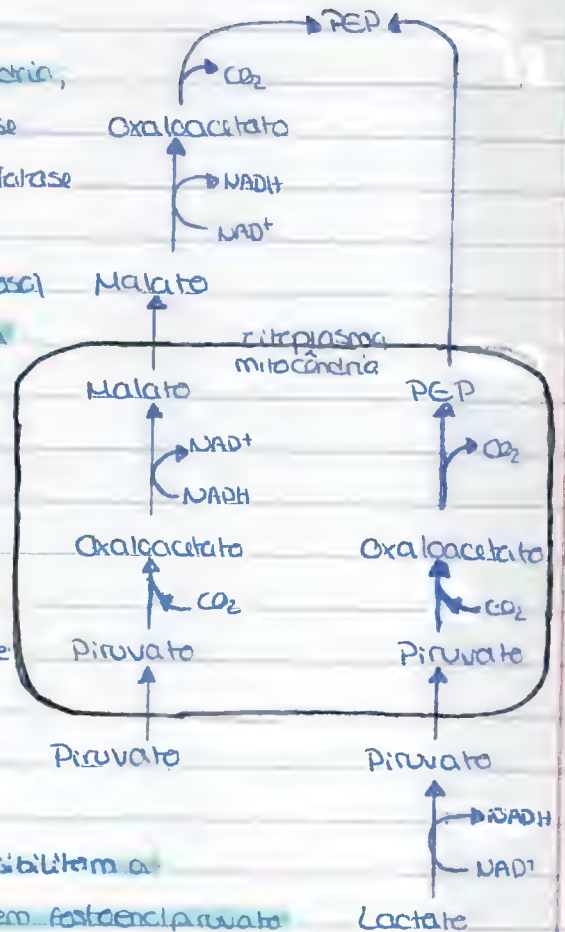
Na conversão de fosfoenolpiruvato em frutose 1,6-bifosfato, são usadas enzimas da glicólise

- Estes passos são todos reversíveis (com $\Delta G^{\circ} \approx 0$) e por isso a sua direção é controlada pelas concentrações relativas de reagentes e produtos

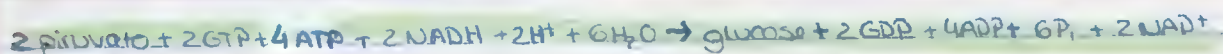
A conversão de frutose 1,6-bifosfato em frutose-6-fosfato é irreversível. A enzima frutose 1,6-bifosfatase é uma enzima alostérica que participa na regulação da gluconeogénese

- A enzima glucose 6-fosfatase é regulada, e só está presente nos tecidos cuja função é manter constante a concentração de glucose no sangue (fígado e rins)
- A formação de glucose livre constitui também um ponto de controlo importante. Esta reação dá-se no lúmen do retículo endoplasmático

- Na maior parte dos tecidos a gluconeogénese acaba na glucose 6-fosfato que pode ter vários destinos:

Glucose ⇅ Glucose 6-fosfato
- ⇄ Glucose 1-fosfato ⇅ Glicogénio
- ⇅ Frutose 6 fosfato ⇅ Piruvato
- → 6 fosfogluconato → Ribose 5-fosfato

- Assim, quando existir excesso de piruvato e energia na célula vai se dar a gluconeogénese até a glucose 6-fosfato e esta vai armazenar-se como glicogénio uma vez que já temos uma grande concentração de glucose.

Balanço global da gluconeogénese

$$2 \text{ piruvato} + 2GTP + 4ATP + 2NADH + 2H^+ + 6H_2O \rightarrow \text{glucose} + 2GDP + 4ADP + 6P_i + 2NAD^+$$

- Na síntese de glucose a partir do piruvato gastam-se 6 nucleótidos trifosfato (apenas 2 se produzem na glicólise) → os 4 ATP extra são necessários para tornar o inverso da glicólise ($\Delta G^{0'} = +84$ kJ/mol) num processo termodinamicamente favorável ($\Delta G^{0'} = -38$ kJ/mol)

O ciclo de Cori

- No músculo ativo, a velocidade da glicólise é muito superior à do ciclo de Krebs ⇒ acumulação do piruvato → lactato, que é em parte transportado até ao fígado pela corrente sanguínea, onde é convertido em glucose, que é devolvida ao músculo.
  - A fermentação láctica nos músculos permite "ganhar tempo" e este ciclo permite desviar algum "trabalho metabólico" do músculo para o fígado

- Em células que fazem glicólise e gluconeogénese, quando um processo está ativo o outro está inativo.

Regulação

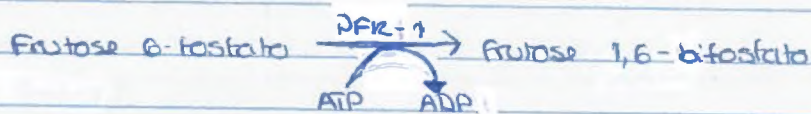
- A glicólise e a gluconeogénese têm regulação recíproca.

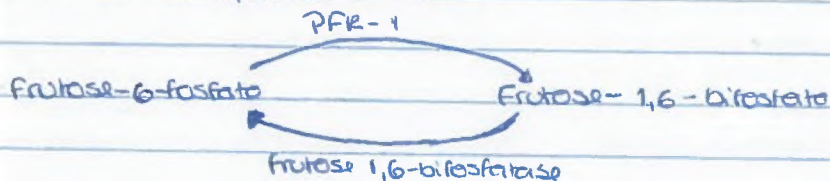
Hexocinase

- Hexocinase catalisa o primeiro passo irreversível da glicólise
- É inibida pelo produto glucose 6-fosfato (G-6P)
- Níveis elevados de G-6P indicam que a célula não necessita de glucose para obter energia, armazenamento ou percursores de biossíntese

PFK1

- Fosfofrutocinase (PFK-1) é o ponto de regulação mais importante da glicólise (passo limitante da via glicolítica

Frutose 6-fosfato —PFK-1→ frutose 1,6-bifosfato
(ATP → ADP)

- É uma enzima alostérica regulada por:
  - (+) AMP (sensor de energia)
  - (+) frutose 2,6-bifosfato (sensor de glucose no sangue)
  - (-) citrato (sensor de blocos percursores)
  - (-) ATP
  - (-) H^+ (sensor de pH) → a $[H^+]$ vem da ferm láctica e se ↑ vai para a glicólise de modo a não haver formação de lactato

Frutose-6-fosfato —PFK-1→ Frutose-1,6-bifosfato
Frutose-1,6-bifosfato —Frutose 1,6-bifosfatase→ Frutose-6-fosfato

- A frutose-2,6-bifosfato é um ativador da PFK-1 e é produzida por fosforilação da frutose-6P pela ação da PFK-2

Ativação:

1) [AMP]/[ATP] ↑ → sinalização de necessidade de energia

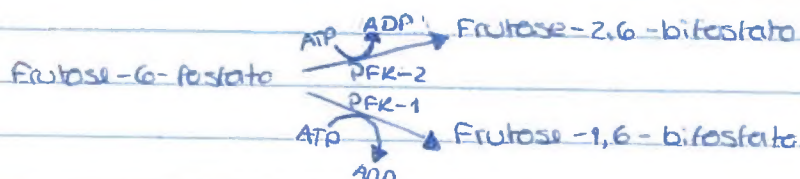
2) [frutose-2,6-bifosfato] ↑ é um ativador alostérico que desloca o equilíbrio no sentido da glicólise, aumentando a afinidade para o substrato (frutose 6-fosfato). A formação da frutose-2,6-bifosfato é dependente dos níveis de insulina e glucagon via a PFK-2

Inibição:

1) $[H^+]$↑ - impede a descida brusca do pH no sangue devido à excessiva produção de lactato

2) [citrato]↑ - intermediário do ciclo de krebs, indicando que há blocos percursores suficientes para a biossíntese

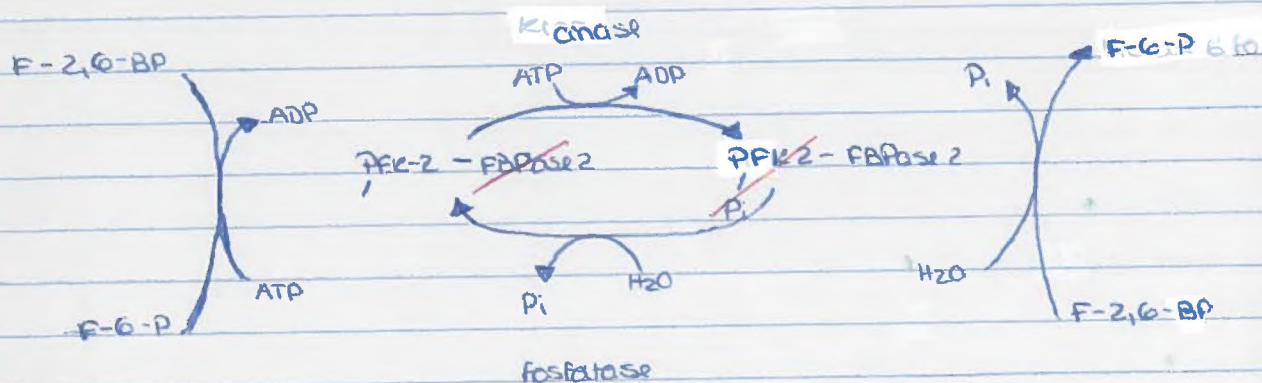
PKF-2

Frutose-6-fosfato —PFK-2 (ATP → ADP)→ Frutose-2,6-bifosfato
Frutose-6-fosfato —PFK-1 (ATP → ADP)→ Frutose-1,6-bifosfato

A PFK-2 é uma enzima bifuncional

A síntese e degradação de F-2,6-BP tem controle hormonal

A F-2,6-BP é um modulador importante

(+) fosfofrutocinase ← glicólise

(-) frutose-2,6-bifosfatase – gluconeogênese

Regulação da PFK-1 pela PFK-2

- A PFK-2 é uma enzima bifuncional
- No fígado quando o nível de glicose no sangue é baixa, o glucagon ativa a síntese de cAMP, a PFK-2 é fosforilada pela proteína cinase A → o domínio com função de fosforilação é inativado e o seu domínio de fosfatase é ativado, convertendo a F-2,6-BP em F6P:
  - na forma desfosforilada é uma cinase - fosfofrutose fosfofrutose cinase (F6P + ATP → F2,6-BP)
  - na forma fosforilada é uma fosfatase → frutose-1,6-bifosfatase (F-2,6-BP → F6P+Pi)
- O glucagon e a epinefrina estimulam a produção de cAMP no fígado:
  - [F-2,6-BP]↓ → inibição PFK-1 e inibição da função da F-1,6-BPase da PFK-2 → ativação da gluconeogênese

Piruvato cinase

- Catalisa o terceiro passo irreversível da glicólise; controla o fluxo de saída deste caminho metabólico

Ativação: frutose

Inibição: ATP e alanina que indicam que não há necessidade de energia nem blocos percursores para biossíntese e a glicólise deve ser inibida

A regulação na gluconeogênese

- Dentro da mesma célula, a glicólise e a gluconeogênese nunca podem ocorrem em simultâneo, pois conduziriam apenas a dissipação de energia.
  - A regulação recíproca destes caminhos metabólicos é feita a nível das atividades e das quantidades das enzimas
  - A velocidade da glicólise também é controlada pela concentração da glucose e a da gluconeogênese pela concentração do lactato e outros precursores da glucose
- Regulação das atividades das enzimas:
  - Quando a carga energética é baixa ([AMP]↑) e há falta de precursores para a biossíntese ([Citrato]↓), a glicólise é estimulada e a gluconeogênese inibida
  - A F-2,6-BP responde ao nível de glucose no sangue; quando este é elevado a glicólise é estimulada e a gluconeogênese inibida, quando este é baixo dá-se o contrário
  - O caminho da gluconeogênese só se inicia a partir do piruvato se houver energia e blocos precursores suficientes ([ADP]↓) e ([acetil-CoA]↑)
- Regulação das quantidades de enzimas: as quantidades das enzimas são também reguladas por hormonas que afetam a expressão dos genes, quer a nível da velocidade de transcrição quer a nível da degradação dos mRNAs.
  - Insulina (aumenta após a refeição): estimula a produção da fosfofrutocinase e da piruvato cinase (enzimas da glicólise) e da enzima bifuncional que produz e degrada F-2,6-BP
  - Glucagon (aumenta se há fome): inibe a expressão destes genes e estimula a fosfoenolpiruvato carboxicinase e a frutose-1,6-bifosfatase (enzimas da gluconeogénese)